

**ONTOGENIA DE LOS ESPORANGIOS Y ESPOROGÉNESIS DE *Lycopodiella cernua* (L) Pic. Serm. Y *Lycopodiella descendens* B. Øllg (LYCOPODIACEAE).**

HELKIN GIOVANI FORERO BALLESTEROS

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Bucaramanga

2011

**ONTOGENIA DE LOS ESPORANGIOS Y ESPOROGÉNESIS DE *Lycopodiella cernua* (L) Pic. Serm. Y *Lycopodiella descendens* B. Øllg. (LYCOPODIACEAE).**

HELKIN GIOVANI FORERO BALLESTEROS

Proyecto de Grado

Director:

Edgar Javier Rincón Barón

Biólogo

Candidato a Doctor

Codirector:

Dagoberto Manuel Arrieta Prieto

Profesor Asociado

Universidad Industrial de Santander

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Bucaramanga

2011

## **AGRADECIMIENTOS**

A Edgar Javier Rincón Barón y a Dagoberto Manuel Arrieta Prieto, gestores y directores de este proyecto.

Al profesor Andrés Torres y a Lyda Patricia Mosquera, de la Unidad de Microscopía de la Universidad de Cauca por su colaboración durante la pasantía.

A Cristina Rolleri (Laboratorio de Estudios de Anatomía Vegetal Evolutiva y Sistemática, Facultad de Ciencias Naturales y Museo de La Plata, Argentina), por facilitar material bibliográfico.

A mis compañeros, especialmente a Leidy Viviana Gélvez y Yury Álvarez quienes fueron un gran apoyo durante el desarrollo del proyecto.

A mi madre Ángela Ballesteros y mi hermana Adriana Forero, por su colaboración, dedicación y amor para salir adelante tanto a nivel profesional como personal

A los docentes de la escuela de Biología de la Universidad Industrial de Santander, por sus conocimientos aportados a lo largo de la carrera.

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	11
1.MARCO TEÓRICO	12
2. MATERIALES Y MÉTODOS	15
2.1Recolecta del material	15
2.2Fijación, corte y coloración	15
2.3Observación y análisis	16
3.RESULTADOS	16
3.1Aspecto general	16
3.2Ontogenia de los esporangios y esporogénesis de <i>L. cernua</i> y <i>L. descendens</i>	17
3.3Morfometría de algunas estructuras asociadas al esporangio y esporas de <i>L. cernua</i> y <i>L. descendens</i>	27
3.4Pruebas histoquímicas	29
3.4.1.Identificación de mucopolisacáridos con la coloración de ácido periódico de Schiff (PAS).	29
3.4.2Identificación de mucopolisacáridos sulfatados con la coloración de Azul de Alcian contrastado con Safranina O	30
3.4.3.Identificación de calosa con la coloración de Azul de anilina, con microscopía de fluorescencia con filtro UV (Filtro de excitación 330-380 nm y filtro barrera 420 nm).....	32
4. DISCUSIÓN	32
5.CONCLUSIONES	39
6.RECOMENDACIONES	41
7.BIBLIOGRAFÍA	42

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.	Medidas morfométricas de <i>Lycopodiella cernua</i> .	28
Cuadro 2	Medidas morfométricas de <i>Lycopodiella descendens</i>	28

<b>LISTA DE FIGURAS</b>		<b>Página</b>
Figuras. 1 a 2.	Plantas de <i>L. cernua</i> y <i>L. descendens</i> .	17
Figuras 3 a 6	Primeras etapas de la ontogenia del esporangio en <i>L. cernua</i>	19
Figuras 7 a 10	Tejido esporógeno y esporocitos de <i>L. cernua</i> .	20
Figuras 11 a 16	Estado de díada y tétradas en diferentes etapas de maduración de <i>L. cernua</i>	21
Figuras 17- 20	Degradación de los estratos de la pared del esporangio y el tapete, células de la pared definitiva del esporangio y células del pedicelo de <i>L. cernua</i> .	22
Figuras 21 a 24	Primeras etapas de la ontogenia de los esporangios en <i>L. descendens</i> .	23
Figuras 25 a 28	Tejido esporógeno y esporocitos de <i>L. descendens</i> .	24
Figuras 29 a 34	Estado de díada y tétradas en diferentes etapas de maduración de <i>L. descendens</i> .	25
Figuras 35 a 38	Degradación de los estratos de la pared del esporangio y el tapete, células de la pared del esporangio y células del pedicelo de <i>descendens</i> .	26
Figuras 39 a 42	Identificación de mucopolisacáridos durante la ontogenia de los esporangios y esporogénesis de <i>L. cernua</i> utilizando la tinción de PAS.	29
Figuras 43 a 46	Identificación de mucopolisacáridos sulfatados y carboxílicos durante la esporogénesis durante la ontogenia de los esporangios y esporogénesis de <i>L. cernua</i> y <i>L. descendens</i> utilizando la tinción de azul de Alcian-safranina O.	31
Figuras 47 a 48	Fluorescencia de cortes permanentes de los esporangios de <i>L. cernua</i> utilizando filtro UV para la detección de calosa.	32

## Titulo

### **ONTOGENIA DE LOS ESPORANGIOS Y ESPOROGÉNESIS DE *Lycopodiella cernua* (L.) Pic. Serm. Y *Lycopodiella descendens* B. Øllg. (LYCOPODIACEAE).**

**Autor** Helkin Giovani Forero Ballesteros \*\*

**Palabras clave** *Lycopodiella*, Lycopodiaceae, ontogenia, esporogénesis, histoquímica.

**DESCRIPCIÓN DEL CONTENIDO:** Los estudios sobre la ontogenia de los esporangios y la esporogénesis de los licopodios son escasos. El material de *Lycopodiella cernua* y *Lycopodiella descendens* fué recolectado en los departamentos de Santander y Valle del Cauca (Colombia). Los estróbilos fueron clasificados en siete etapas de maduración de las cuales se tomaron diez estróbilos por cada uno de estas para ser procesados según las técnicas tradicionales de embebido en parafina. Los cortes fueron teñidos con safranina O–*fastgreen*, reactivo de Schiff, azul de Alcian y azul de anilina. Así mismo, el material fresco fue teñido con aceto-orceína láctica. Las observaciones se efectuaron con microscopio fotónico de alta resolución con contraste diferencial de interferencia (DIC) y microscopio de fluorescencia. Los esporangios de las dos especies se localizan en la base de los esporófilos y maduran de forma basípeta; el desarrollo de los esporangios inicia a partir de un grupo de células epidérmicas que se dividen activamente, estableciéndose dos estratos celulares: el estrato externo, que se diferenciará en la pared del esporangio y el tapete de tipo secretor; el estrato interno se diferencia en el tejido esporógeno. El tejido esporógeno se divide y se diferencia en los esporocitos, los cuales experimentan meiosis para formar díadas y posteriormente tétradas en disposición tetraédrica. Al finalizar la maduración del esporangio, las esporas quedan libres en la cavidad del esporangio; éstas presentan ornamentación rugulada y lesura trirrasgada. Para este momento, el tapete ha desaparecido y la pared del esporangio presenta engrosamientos en las paredes anticlinales y periclinal interna. Durante todo el desarrollo de los esporangios y la esporogénesis de *L. cernua* y *L. descendens* se observaron canales basales de mucílago de tipo lisogénico en los esporófilos. El análisis histoquímico fue positivo para polisacáridos sulfatados y mucílago y negativo para calosa.

\* Proyecto de Grado

\*\* Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Biología. Director: Edgar Javier Rincón Barón. Codirector: Dagoberto Manuel Arrieta Prieto.

## ABSTRACT

**TITLE:** ONTOGENY OF SPORANGIA AND SPOROGENESIS OF *Lycopodiella cernua* (L.) Pic. Serm. AND *Lycopodiella descendens* B. Øllg. (LYCOPODIACEAE).

**AUTHOR:** Helkin Giovanni Forero Ballesteros \*\*

**KEY WORDS:** *Lycopodiella*, Lycopodiaceae, sporangium ontogeny, sporogenesis, histochemistry.

**CONTENT DESCRIPTION:** Studies on the ontogeny of sporangia and sporogenesis of clubmosses are scarce. Material of *Lycopodiella cernua* and *Lycopodiella descendens* was collected in the departments of Santander and Valle del Cauca (Colombia). The strobili were classified into seven stages of maturation; ten strobili from each of these stages were processed according to traditional techniques embedded in paraffin. The sections were stained with safranin O-fastgreen, Schiff reagent, Alcian blue and aniline blue. Also, fresh material was stained with lactic aceto-orcein. The observations were made with photonic microscope with high resolution differential interference contrast (CDI) and fluorescence microscope. The sporangia of both species are located at the base of the sporophylls and mature basipetally. The development of sporangia starts from a group of actively dividing epidermal cells. Two cell layers are first apparent: the outer layer, which will differ on the wall of the sporangium and the secretory tapetum, and the inner layer, which forms the sporogenous tissue. Cell division of the sporogenous results in the formation of the sporocytes, which undergo meiosis to form dyads and tetrahedral tetrad. After the maturation of the sporangium, the spores are released into the cavity of the sporangium; they have trilete lesure and rugulate ornamentation. By this time, the tapetum has readsorbed and the inner periclinal and the anticlinal walls of the epidermal cells of the sporangium become thicker. Throughout the development of sporangia and sporogenesis of *L. descendens* and *L.cernua* it was observed the formation the lysogenic basal mucilage channels in sporophylls. Histochemical analysis was positive for sulfated polysaccharides, mucilage and negative for callose.

\* Proyecto de Grado

\*\* Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Biología. Director: Edgar Javier Rincón Barón. Codirector: Dagoberto Manuel Arrieta Prieto

## INTRODUCCIÓN.

La familia Lycopodiaceae agrupa actualmente los géneros: *Huperzia* Bernh., *Lycopodium* L., *Phylloglossum* Kunze. y *Lycopodiella* Holub. Todos, con excepción de *Phylloglossum*, que crece en el sureste de Australia, Nueva Zelandia y Tasmania, tienen amplia distribución geográfica y son cosmopolita (Øllgaard 1992, Rolleri *et al.* 2010). *Lycopodiella* cuenta aproximadamente con 40 especies, distribuidas en su mayoría en las Américas; en el Neotrópico se encuentran 25 especies, que representan las tres secciones reconocidas por Øllgaard (1992): *Lycopodiella* sect. *Lycopodiella*, *Lycopodiella* sect. *Carolianiana* y *Lycopodiella* sect. *Campylostachys*. En esta última se incluyen las especies *Lycopodiella cernua* (L.) Pic. Serm. y *Lycopodiella descendens* B. Øllg., que se caracterizan morfológicamente por un tallo principal erecto, con ramificaciones horizontales recurvadas, terminadas en estróbilos péndulos relativamente pequeños, con esporangios subglobosos, encerrados en cavidades formadas por el córtex del estróbilo y coalescente a la membrana basal de los esporófilos adyacentes (Øllgaard 1988, 1992).

Enseguida se mencionan varios de los trabajos sobre la morfología de las estructuras reproductivas en licopodiáceas. Sikes (1908), dio a conocer las primeras descripciones sobre la estructura y organización de los esporangios; Wilce (1972) describió las esporas de *Lycopodium*, *Lycopodiella* y *Huperzia*, y propuso grupos con base de la ornamentación; Øllgaard (1975) y Rolleri (1979) estudiaron la estructura y el modelo epidérmico de la pared del esporangio de especies incluidas hasta ese momento en el género *Lycopodium*, y resaltaron la importancia de estos caracteres en la sistemática. Uehara & Kurita (1991) analizaron la morfogénesis de la pared de la espora de *L. clavatum* L. en un estudio ultraestructural, e incluyeron algunos aspectos relacionados con la esporogénesis desde sus primeras etapas. Solé de Porta & Murillo-Pulido (2005), mediante microscopía fotónica, describieron las esporas de 24 especies de *Huperzia*, cuatro de *Lycopodiella*, dos de *Lycopodium* y 38 de otros helechos pertenecientes a las familias Schizaeaceae, Pteridiaceae, Cyatheaceae y Parkeriaceae, presentes en Colombia. Rincón *et al.* (2009) describieron detalladamente, la ontogenia de los esporangios y esporogénesis de *Huperzia brevifolia* (Grev. & Hook.) Holub. Finalmente, Rolleri *et al.* (2010) elaboraron un estudio taxonómico para el noroeste de Argentina, a partir del cual se amplió la distribución conocida para *Huperzia reflexa* (Lam.) Trevis y *Lycopodiella cernua* para el cono sur. Estos autores, reevaluaron caracteres morfológicos y detallaron los engrosamientos presentes en las paredes del esporangio y la composición de estos mediante pruebas microquímicas en estas dos especies.

Los trabajos anteriormente citados han descrito algunos detalles de la esporogénesis y la estructura de los esporangios de algunas licopodiáceas, Sin embargo, no hay trabajos que realicen una descripción precisa de la ontogenia de los esporangios y la esporogénesis en *Lycopodiella*. En este estudio se describe detalladamente la ontogenia de los esporangios y la esporogénesis de *L. cernua* y de *L. descendens*. También se realizaron pruebas histoquímicas para la detección de mucopolisacáridos y calosa; estas sustancias posiblemente intervienen en los procesos de formación del esporangio y el proceso de esporogénesis. Los resultados se analizan comparativamente con otras especies de licopodiáceas, briófitos y pteridófitos homósporos. Con lo anterior se contribuye al conocimiento sobre la biología reproductiva de las licopodiáceas encontradas en Colombia.

## 1. MARCO TEÓRICO

Las familias Lycopodiaceae, Selaginellaceae e Isoetaceae están agrupadas en la división Lycopsidea, sobre la base de la presencia de eusporangios adaxiales y diferenciación exarca del xilema (Gensel 1992, Kenrick & Crane 1997, Schneider *et al.* 2004). Kenrick & Crane (1997) las consideran monofiléticas por la presencia de micrófilos uninervios con traza foliar exclusivamente xilemática. Sin embargo, Bateman *et al.* (1992) indicaron que la division puede ser un grupo parafilético, por la presencia de un clado heteróspero (Isoetaceae y Selaginellaceae). La familia Lycopodiaceae, es un grupo de plantas herbáceas que se encuentra principalmente en zonas tropicales, en bosques de hoja perennifolios de América del Sur y del Sudeste de Asia, y en los páramos y subpáramos andinos (Øllgaard 1988, 1992). La familia agrupa actualmente cuatro géneros: *Huperzia*, *Lycopodiella*, *Lycopodium* y *Phylloglossum*, que en conjunto contiene cerca de 500 especies aproximadamente, de las cuales 185 son neotropicales; de estas 150 pertenecen al género *Huperzia*, 27 a *Lycopodiella* y ocho a *Lycopodium* (Øllgaard, 1992). En Colombia se han registrado 42 especies de *Huperzia*, nueve de *Lycopodiella* y cuatro de *Lycopodium* (Murillo & Murillo, 1999).

Los estudios en Lycopodiaceae, incluyen revisiones taxonómicas, sistemáticas y floras locales como las de Øllgaard (1987, 1988, 1992, 1996), Santa (1986, 1989), Tardieu-Blot (1971), Toursarkissian (1971), Rolleri (1971, 1975, 1978, 1981, 1984, 1985 a,b, 1989), Rolleri & Deferrari (1989), Tryon & Stolze (1994), Murillo & Harker (1990), Murillo & Murillo (1999), Rodríguez (2002) y Ramírez & Macías (2007); se cuentan con estudios en morfología por ejemplo los de Rolleri (1972 a-b), Rolleri (1974, 1976, 1977 a-b, 1980, 2010), Øllgaard (1975), Rolleri & Deferrari (1986). Citología como por ejemplo los de Rolleri (1982 a,b), y estructura y esporogénesis,

tales como los de Wilce (1972), Øllgaard (1975), Rolleri (1979), Uehara & Kurita (1991), Solé de Porta & Murillo-Pulido (2005) y Rincón *et al.* (2009).

Las características más distintivas en las especies de Lycopodiaceae son: la disposición de las hojas en espiral que en los taxones actuales son generalmente pequeñas y del tipo micrófilas; en taxones extintos fueron de un tamaño considerablemente mayor (Kaplan 2001, Tomescu 2009). Los esporangios se agrupan en estróbilos (especies estrobiladas) o solitarios a lo largo del eje caulinar (especies no estrobiladas), presentan forma reniforme y se ubican sobre la cara adaxial de los esporófilos, en la porción basal, o en las axilas entre los esporófilos y el eje del estróbilo (Rolleri 1972a, Øllgaard 1987, Pita *et al.* 2006).

Øllgaard (1992), describió la morfología y taxonomía de las especies de Lycopodiaceae y observó caracteres morfológicos claves para la identificación de éstas. Este autor describe a las especies de *Lycopodiella*, como plantas de hábitos diversos, con ramificaciones anisotómicas, con brotes vegetativos postrados y ramificaciones erectas que surgen dorsalmente de las que se originan otras ramas levemente recurvadas, dando aspecto de árbol. En estas ramificaciones se originan los estróbilos péndulos. Los tallos presentan estelas en disposición radial con xilema sectado, característica de la sección *Campylostachis* a la cual pertenecen especies como *L. cernua*, *L. descendens*, *L. camporum* B. Øllg. & Wind., *L. trianaea* B. Øllg., *L. glaucescens* B. Øllg., *L. pendulina* (Hook) B. Øllg., *L. lehmannii* (Hieron) B. Øllg., *L. contorta* (L. Underw & F. Lloyd) B. Øllg., *L. riofrioi* B. Øllg., *L. steyermarkii* B. Øllg., *L. bradei* (Herter) B. Øllg. Esta sección también se caracteriza por presentar estróbilos péndulos en las ramificaciones laterales, hojas pequeñas, terminando usualmente en pelos unicelulares, esporangios subglobosos, anisovalvados, encerrados en cavidades formadas por el córtex estrobilar y coalescentes a la membrana del esporofilo adyacente. Las especies en esta sección se encuentran generalmente en regiones tropicales y comunmente son pioneras de suelos perturbados. *L. cernua* es pantropical y puede ser confundida con *L. descendens*, la cual se encuentra principalmente en las laderas orientales andinas de Ecuador y Perú. *L. descendens* es una especie difícil de definir y algunos autores la consideran como un ecotipo de *L. cernua* (Rolleri comunicación personal). No obstante, Øllgaard (1988) diferenció estas dos especies por las siguientes características: *L. descendens* presenta estróbilos con longitud máxima de 3.0 cm, mientras que en *L. cernua* la medida máxima es de 2.0 cm, además de la presencia de hojas adpresas y con gran densidad de pelos en las ramas principales de *L. descendens*.

Es posible observar que las características morfológicas externas son insuficientes al tratar de definir algunos taxones, siendo necesario buscar otros caracteres

diagnósticos útiles a nivel de especie; de esta manera, los datos estructurales de los procesos de ontogenia y esporogénesis pueden ser de utilidad.

Dados estos antecedentes, es clara la importancia de trabajos dedicados a la descripción de las estructuras reproductivas de los licopodios, siendo este un grupo importante en las plantas vasculares y sobre el cual es poco lo que se conoce sobre la biología reproductiva (Uehara & Kurita 1991, Rincón *et al.* 2009, Rolleri *et al.* 2010)

Por otra parte, son pocos los trabajos realizados sobre la identificación de metabolitos implicados en los procesos fisiológicos en licopodios. Hasta la fecha solo se han documentado algunos trabajos en este tópico, por ejemplo los de Rolleri (1972a) e Ibars *et al.* (1988) determinan que la principal reserva de las estructuras vegetativas es el almidón. Así mismo, algunos trabajos se han enfocado al estudio de los mucílagos presentes en las estructuras reproductivas de *Huperzia*, *Lycopodium*, *Lycopodiella* y *Sellaginella* (Bruce 1976, Rolleri 1976, Bilderback 1987).

Para la detección de mucopolisacáridos en tejidos animales y vegetales, se han aplicado técnicas como la del Ácido Periódico Schiff (PAS). Esta tinción detecta la presencia de polisacáridos simples, mucopolisacáridos neutros, mucoproteínas, glucoproteínas o glucolípidos (Jensen 1962; Lyon *et al.* 1991; Ruzin 1999). Así mismo, la tinción con azul de Alcian es también utilizada para detectar mucopolisacáridos sulfatados o fuertemente sulfatados y carboxílicos dependiendo del pH del colorante. (Johannes & Klessen 1984, Ruzin 1999, Steedman 1950, Pearse 1985, Prentø *et al.* 1991). En algunos estudios se ha implementado el azul de Alcian sobre montajes permanentes de parafina, observando la afinidad de este colorante por los polisacáridos con grupos carboxílicos presentes en la pared de las células vegetales (Graham & Joshi 1995).

En algunas especies de Magnoliophyta y Liliophyta, se ha detectado la presencia de calosa en las paredes del polen y en las paredes celulares en preparaciones teñidas con azul de anilina y observadas con microscopía de fluorescencia usando filtro ultravioleta. Este metabolito es importante durante la microsporogénesis y al parecer se relaciona con la formación de la exina en los granos de polen en las plantas vasculares (Stanley & Linskens 1974, Waterkeyn & Beinfait 1970, Zhang *et al.* 2002, Dong *et al.* 2005). Aplicando esta técnica es posible determinar si la calosa interviene en la formación de las paredes de las esporas de los licófitos.

Este tipo de análisis histoquímicos son importantes ya que permiten la identificación de sustancias específicas dentro de los tejidos, con lo cual se puede especular el estado fisiológico por el cual está atravesando una estructura en

particular y la función de ésta (Ruzin 1999), durante los procesos de ontogenia de los esporangios y la esporogénesis.

A pesar de los trabajos realizados sobre algunos aspectos de la biología reproductiva en licopodiáceas (Rolleri 1972a, Øllgaard 1987, Uehara & Kurita 1991, Pita *et al.* 2006, Rincón *et al.* 2009) no se cuenta con descripciones estructurales detalladas y análisis histoquímicos sobre la ontogenia de los esporangios y la esporogénesis en *Lycopodiella*. Este trabajo estudia de manera detallada los procesos mencionados anteriormente y emplea pruebas histoquímicas para determinación de mucopolisacáridos y calosa en las especies *L. cernua* y *L. descendens* encontradas en los Andes colombianos.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS:

### 2.1 Recolecta del material

Los ejemplares de *L. cernua* fueron recolectados en la localidad Alto de los Padres, en la vía Bucaramanga-El Picacho, departamento de Santander a 7° 07' 39" N, 73° 07' 54." W y 1624 m de altitud, y los de *L. descendens* en inmediaciones del Rio Pance, en el departamento del Valle del Cauca<sup>1</sup> a 3° 21' 19" N, 76° 34' 35" W y 1454 m de altitud. Este material fue recolectado en el mes de en el mes de Marzo, que corresponde a época de lluvia, en el año 2010 y el material testigo se encuentra depositado en el Herbario de la Universidad Industrial de Santander (Herbario UIS) Bucaramanga y en el Herbario de la Universidad del Valle (CUVC) Cali, bajo los numeros Forero-Rincón Lc14 para *L. cernua* y Forero- Rincón Ld15 para *L. descendens*.

### 2.2 Fijación, corte y coloración.

Se tomaron diez estróbilos de distintas longitudes, de siete individuos diferentes para cada una de las especie y se fijaron en FAA durante 24 h. El material fijado fue deshidratado según técnicas utilizadas por Ruzin (1999), iniciando en una serie de etanol (70%, 80%, 90%, 95% y 100%), por cinco horas en cada cambio y 12 h en etanol absoluto y se aclaró en dos pasos de xilol, de cuatro y 12 h respectivamente. Las muestras fueron embebidas en Paraplast (Mc Cormick®) durante 12 h a 55°C y se cortaron a 3.5 µm de espesor con micrótopo rotatorio Spencer 820.

---

<sup>1</sup>Según la Autoridad ambiental CDMB (Corporación Regional Autónoma para Defensa de la Meseta de Bucaramanga), y la CVC (Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca), este trabajo no requiere permisos de recolección. Se anexa oficio.

Los cortes fueron teñidos con safranina O-*fastgreen* (Johansen 1940), para la descripción estructural, azul de anilina (pH 9.2); para la observación de calosa, la coloración de ácido periódico de Schiff (PAS) y azul de Alcian (pH 2.5) contrastados con safranina O y hematoxilina de Harris para mucopolisacáridos. Además, se realizaron montajes de material fresco sin fijar de los esporangios, los cuales fueron coloreados con acetorceína láctica por 3 horas, para la observación de los eventos de división celular y estructuras que posiblemente pueden perderse durante el procesamiento de cortes permanentes.

### **2.3 Observación y análisis.**

Las observaciones se realizaron con un microscopio fotónico de alta resolución Nikon 80i Eclipse, equipado con óptica para contraste diferencial de interferencia (DIC) y un microscopio Nikon Eclipse e200 equipado con fluorescencia, utilizando filtro UV (filtro de excitación 330-380nm y filtro barrera 420 nm). Las fotodocumentación de alta resolución y fluorescencia se hizo con cámara digital Nikon DS-2MV, la edición se realizó con NIS Elements<sup>2</sup> versión 3.07 de Nikon y la morfometría se realizó con el software Imagen-Pro Analyzer 6.3 de Media Cybernetics<sup>3</sup>. Todo el procesamiento del material para corte se llevó a cabo en el Laboratorio de Histotecnica de la Escuela de Biología de la Universidad Industrial de Santander y las microfotografías se tomaron en la Unidad de Microscopia Electrónica de la Universidad del Cauca.

Se realizaron medidas de la longitud del eje ecuatorial de las esporas maduras, la longitud de las tétradas en posición radial y lateral, de los engrosamientos de las paredes anticlinales y periclinales de las células de la pared del esporangio y la medida del ancho y largo del pedicelo de esporangios maduros. Todas las medidas morfométricas tomadas son sugeridas por primera vez en este trabajo, excepto las de la longitud del eje ecuatorial de las esporas maduras (Traverse 2007). Estos datos fueron representadas por la medida mínima, máxima, media y desviación estándar, utilizando el software Microsoft Excel 2007.

## **3. RESULTADOS.**

### **3.1 Aspecto general.**

---

<sup>2,3</sup> Las licencias de los respectivos software fueron obtenidas por la Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad del Cauca.

Las plantas de *L.cernua* y *L. descendens*, crecen en suelos arcillosos de ambientes semihúmedos y son similares morfológicamente, ya que presentan ramificaciones primarias que alcanzan una altura aproximadamente de 25 cm hasta 2 m; los estróbilos de *L. cernua* alcanzan tamaños de  $2\text{ cm} \pm 0,3\text{ cm}$  de longitud y los de *L. descendens* miden  $2,5 \pm 0,4\text{ cm}$  (Figs. 1, 2).



**Figs. 1,2.** Plantas de *L. cernua* y *L. descendens* respectivamente. Obsérvese la presencia de los estróbilos péndulos en las dos especies. Es evidente la mayor longitud de los estróbilos en *L. descendens*.

e: estróbilo, rp: rama principal.

### **3.2 Ontogenia de los esporangios y esporogénesis de *L. cernua* y *L. descendens*.**

Los esporangios de *L. cernua* y *L. descendens*, se localizan en la base de los esporófilos y maduran de forma basípeta a lo largo del estróbilo, es decir los esporangios inmaduros se encuentran en el ápice y los maduros en la base. Se observan cámaras de forma subglobosa en la base de los esporófilos, que corresponden a los canales basales de mucílago, los cuales inician su desarrollo a partir de la lisis de un grupo de células localizadas en la base de los esporófilos jóvenes (Figs. 3, 21).

El desarrollo de los esporangios de *L. cernua* y *L. descendens*, inicia a partir de un grupo de células epidérmicas, localizadas en la cara adaxial en la base de los esporófilos (Figs. 4, 22). Este grupo de células presenta divisiones periclinales y anticlinales, con lo cual se establecen dos agregados celulares definidos de

núcleos voluminosos, con granulación difusa, varios nucléolos y citoplasma escaso (Figs.5, 23). Estos agregados a su vez se diferencian en un estrato interno, el cual formará el tejido esporógeno y un estrato externo, que se diferenciará en las células de la pared del esporangio (Figs.6, 24).

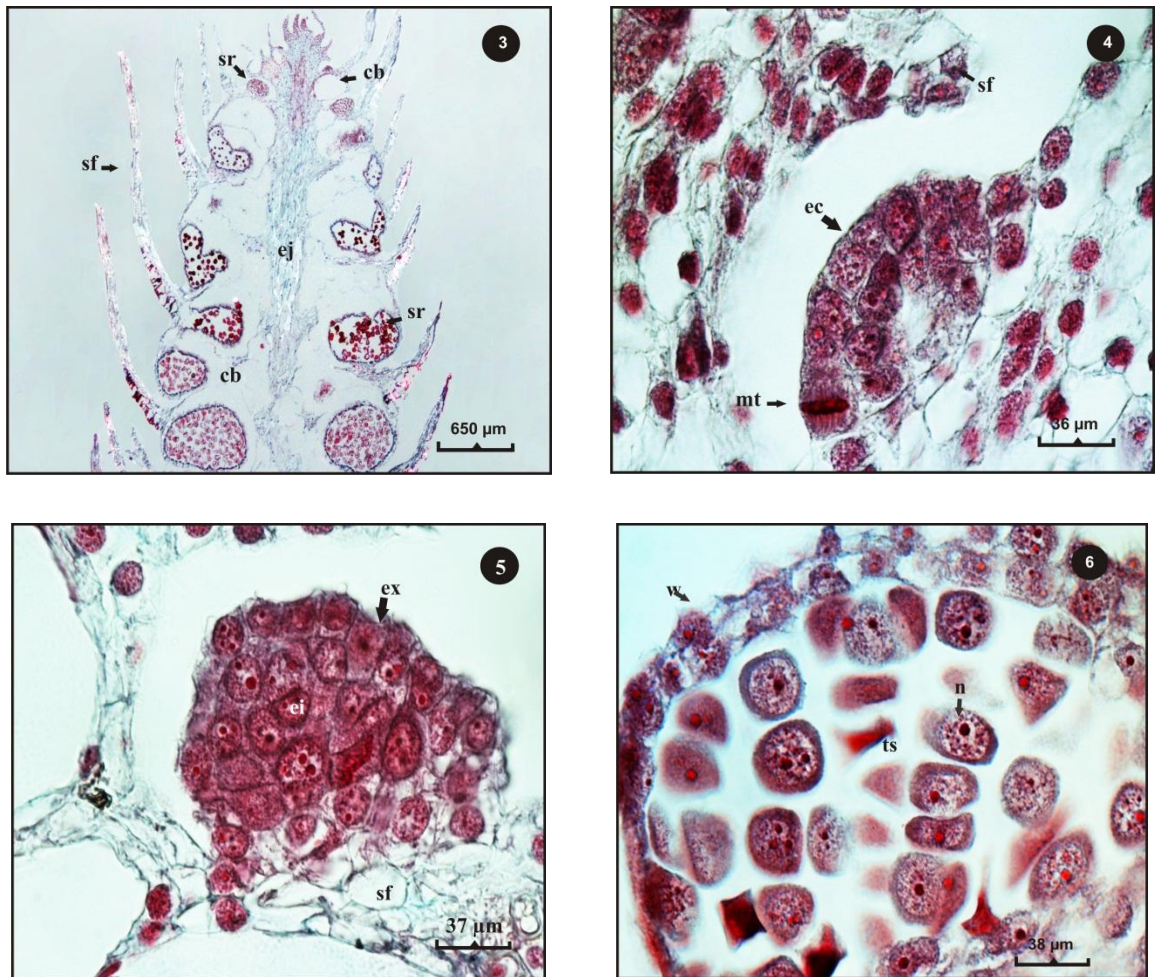
Las células del tejido esporógeno se encuentran densamente agrupadas en el esporangio, presentan tamaños variables, contorno poligonal, núcleos grandes y citoplasma de aspecto granular (Figs. 7, 25). El tejido esporógeno produce los esporocitos que pasan por varias etapas de maduración, se hinchan y se separan quedando libres en la cavidad del esporangio, adquieren forma esférica y están rodeados por la cubierta del esporocito (Figs. 8, 26). Estas células presentan citoplasma con grandes gránulos refringentes de diferentes tamaños y un núcleo en posición central; así mismo, se observó la acumulación de una capa casi continua de material refringente entre la cubierta del esporocito y el esporocito, lo cual es posible observar en montajes en fresco (Figs. 9, 27). En esta etapa se observa la presencia del tapete que deriva de estrato interno de la pared del esporangio durante la diferenciación, separación y maduración de los esporocitos (Figs. 10, 28).

Los esporocitos entran a meiosis I, al final de la cual alcanzan el estado de díada, sin formación de una placa celular que separe los núcleos de las futuras células hijas (Figs. 11 y 29). Al finalizar meiosis II, se forman tétradas jóvenes con esporas en posición tetraédrica donde es posible observar que la capa de material refringente se compacta alrededor de la tétrada y se internaliza entre las esporas en formación (Figs. 12, 30). Las tétradas de *L. cernua* y *L. descendens*, pasan por varias etapas de maduración, que se relacionan con el engrosamiento progresivo de las paredes de las esporas (Figs. 13,14, 31,32), y con la elaboración de la ornamentación rugulada en la cara distal y subrugulada en la cara proximal. Además, en esta etapa se observa que las células del tapete presentan un núcleo alargado (Figs. 15, 33). Finalmente, las esporas con lesura trirrasgada se separan son liberadas en la cavidad del esporangio (Figs. 16, 34). En los montajes permanentes y en fresco de *L. cernua* y *L. descendens*, fue posible observar con claridad la cubierta del esporocito, que se mantiene durante todo el proceso de esporogénesis hasta la liberación de las esporas.

A medida que el esporangio madura, el tapete y las capas celulares adyacentes a éste degeneran progresivamente (Figs. 17, 35), hasta quedar solo un estrato celular, el cual se establece como la pared definitiva del esporangio y desarrolla engrosamientos en las paredes anticlinales y periclinal interna (Figs. 18, 36).

En montajes en fresco de las células de la pared del esporangio de las dos especies estudiadas de *Lycopodiella* coloreados con aceto-orceína láctica y vistos superficialmente, se observan un núcleo central, espesamientos sobresalientes en forma de papilas alrededor del contorno celular y abundantes cloroplastos dispersos por el citoplasma (Figs. 19, 37).

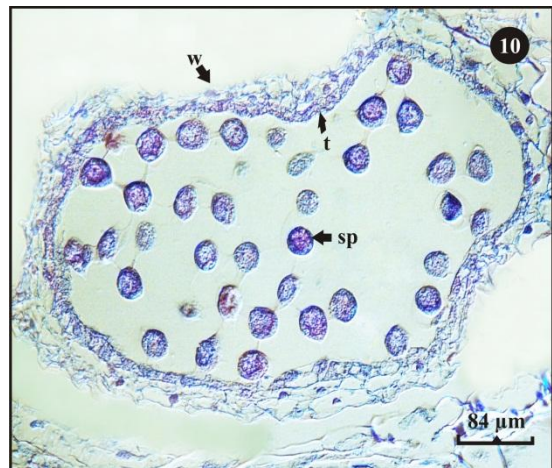
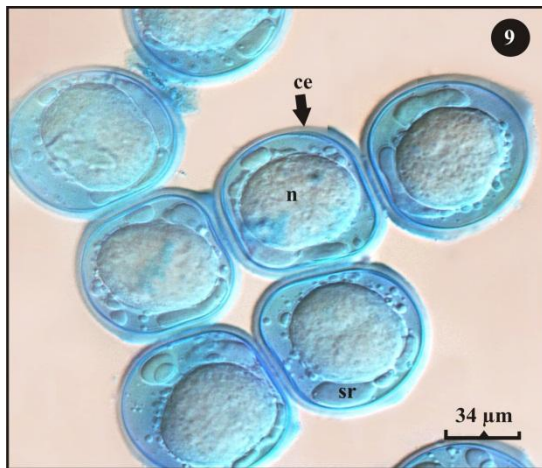
Las células del pedicelo de los esporangios maduros de *L. cernua* y *L. descendens* presentan formas poligonales y desarrollan engrosamientos helicoidales que rodean todo el contorno celular similares a los engrosamientos presentes en las traqueidas presentes en las plantas vasculares (Figs. 20, 38).



Figs. 3- 6. Primeras etapas de la ontogenia del esporangio en *L. cernua*. 3. Corte longitudinal del estróbilo en el cual se observa la maduración basípeta de los esporangios 4. Células epidérmicas a partir de las cuales se formara el esporangio, localizadas en la base de los esporófilos.5. Desarrollo del esporangio

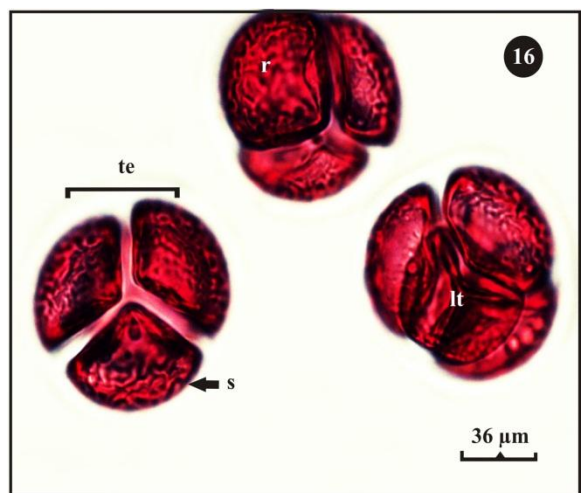
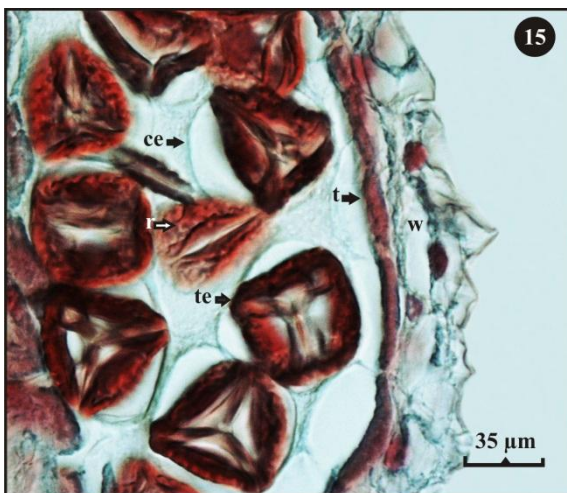
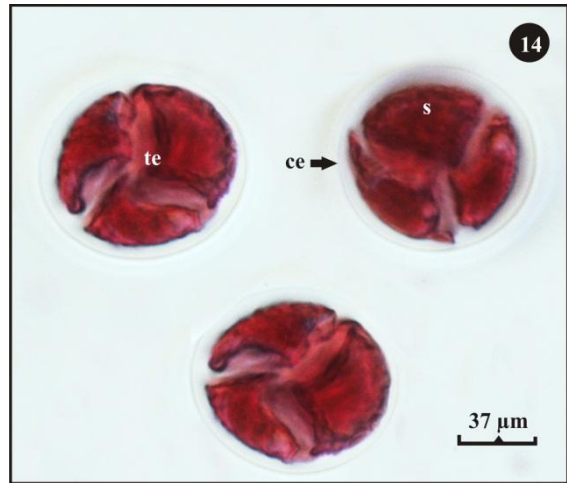
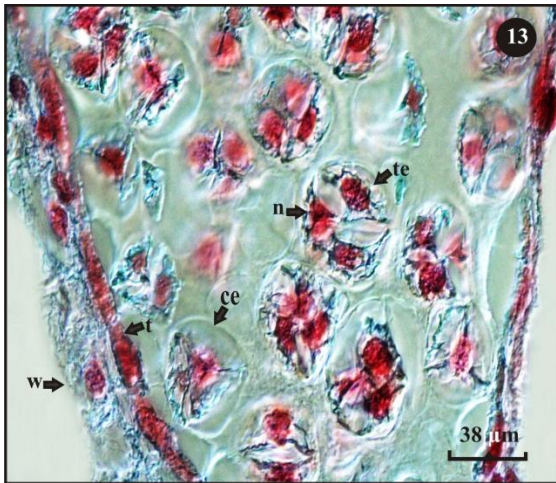
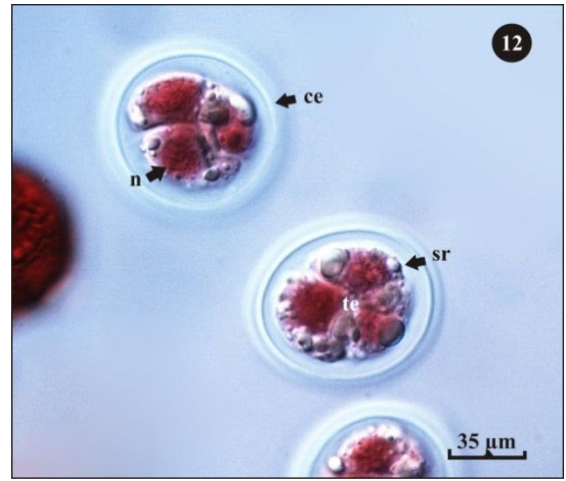
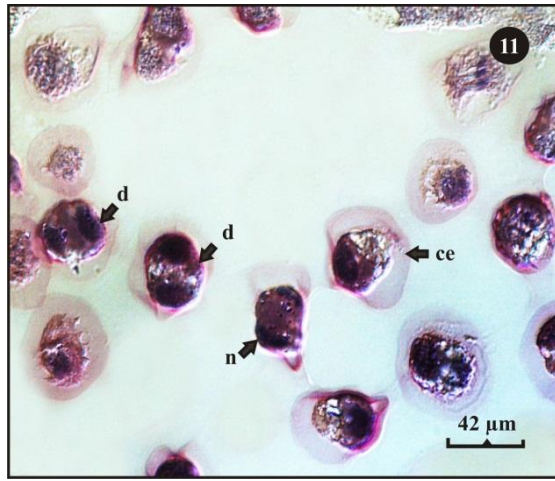
y formación del estrato celular interno y el externo. **6.** Esporangio con pared y tejido esporógeno.

cb: canal basal de mucilago, ec: células epidérmicas, ei: estrato celular interno, ej: eje del estróbilo, ex: estrato celular externo, mt: mitosis, n: núcleo, sf: esporofilo, sr: esporangio, ts: tejido esporógeno, w: pared del esporangio.



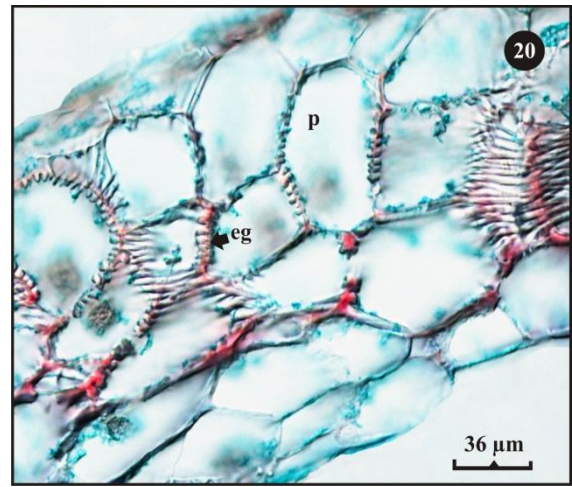
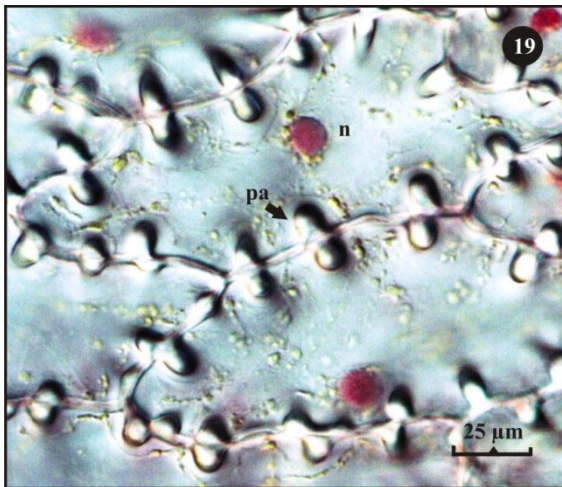
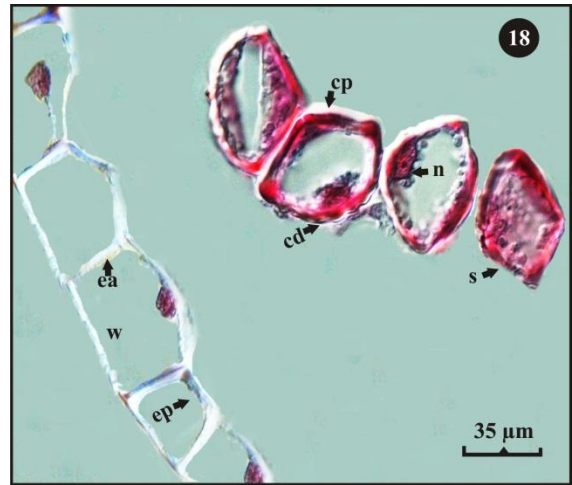
Figs. **7-10.** Tejido esporógeno y esporocitos de *L. cernua*. **7.** Tejido esporógeno coloreado con acetorceína láctica. **8.** Esporocitos premeióticos, hinchados, envueltos por la cubierta del esporocito, con gránulos material refringente en el citoplasma (montaje en fresco teñido con acetorceína láctica). **9.** Esporocitos premeióticos con material refringente entre la célula y la cubierta del esporocito (tinción de azul de Alcian). **10.** Esporangio diferenciado con esporocitos, tapete y células de la pared.

c: citoplasma ce: cubierta del esporocito, n: núcleo, sr: material refringente, sp: esporocitos, t: tapete, ts: tejido esporógeno, w: pared del esporangio.



Figs. 11-16. Estado de díada y tétradas en diferentes etapas de maduración de *L. cernua*. 11. estado de díada al final de meiosis I (montaje permanente coloreado reactivo de Schiff). 12-16 Tétradas en maduración. 12, 14,16: montajes frescos coloreados con aceto-orceína láctica. 13 – 15: cortes permanentes coloreados con Safranina O- fastgreen. Se observa el engrosamiento de las paredes y la formación de la ornamentación rugulada de las paredes de las esporas.

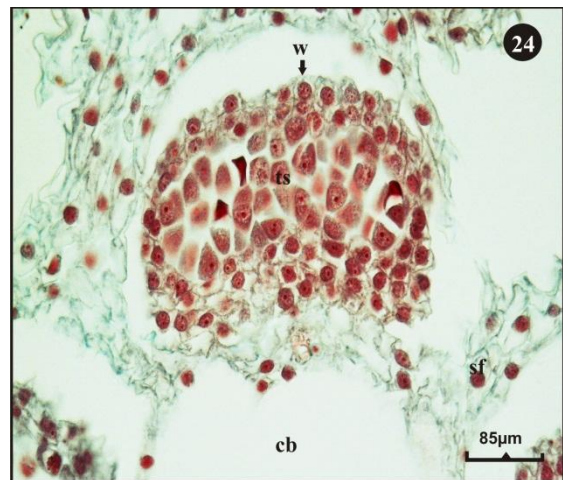
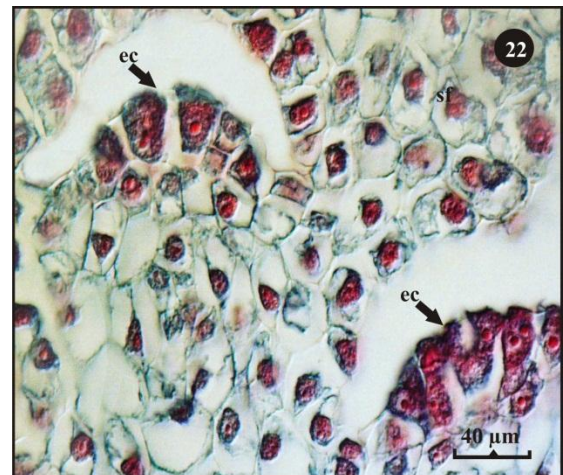
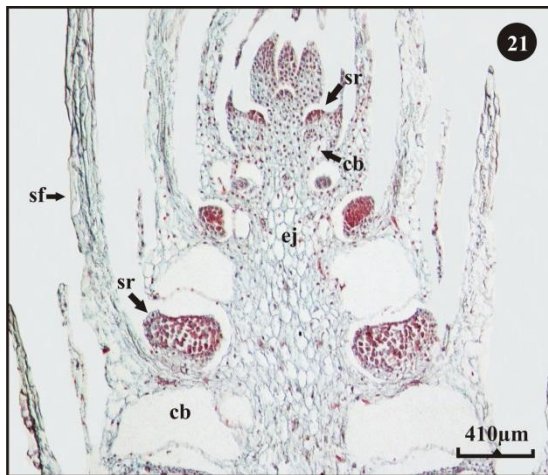
ce: cubierta del esporocito, d: díada, n: núcleo, lt: lesura trirrasgada, p: pedicelo, r: ornamentación rugulada, s: espora, sr: material refringente, t: tapete, te: tétradas, w: pared del esporangio.



Figs. 17-20. Degradación de los estratos de la pared del esporangio y el tapete, células de la pared definitiva del esporangio y células del pedicelo de *L. cernua*. 17. Esporangio con remanentes de las células del tapete. 18. células de la pared definitiva del esporangio; se observa los engrosamientos anticlinales y periclinal interno de las células de la pared del esporangio y las esporas con el núcleo

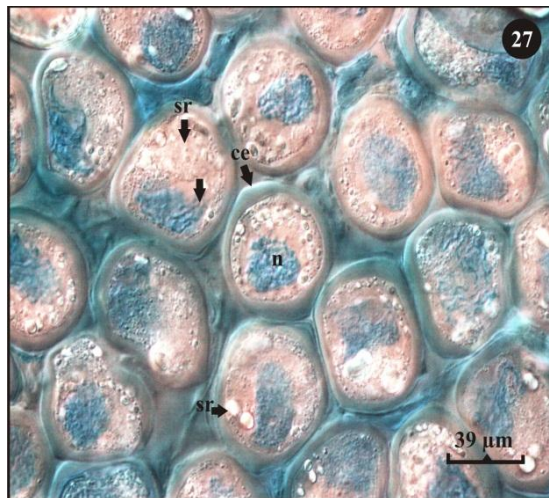
posicionado en la cara distal. **19.** Montaje en fresco de las células de la pared del esporangio coloreado con aceto-orceína láctica y visto en plano superficial. **20.** Células del pedicelo, se observa los engrosamientos periféricos.

cd: cara distal, cp: cara proximal, ea: engrosamiento anticlinal, eg: engrosamientos de las células del pedicelo, ep: engrosamiento periclinal, n: núcleo, p: pedicelo, pa: engrosamientos en forma de papilas en la pared del esporangio, r: ornamentación rugulada, s: espora, t: tapete, te: tétrada, w: pared del esporangio.



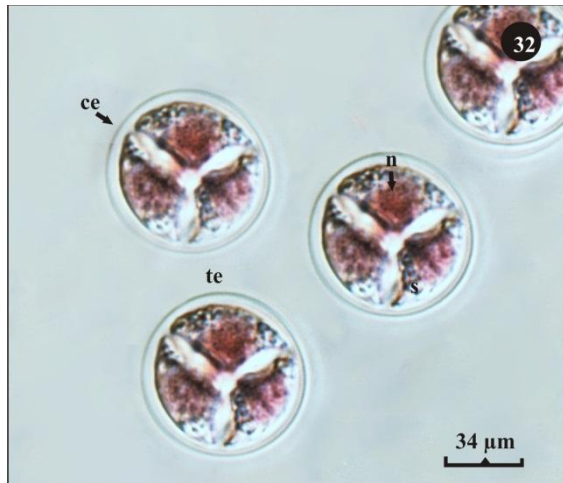
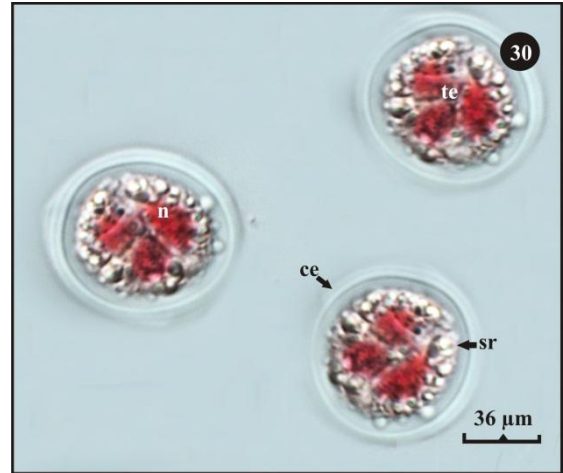
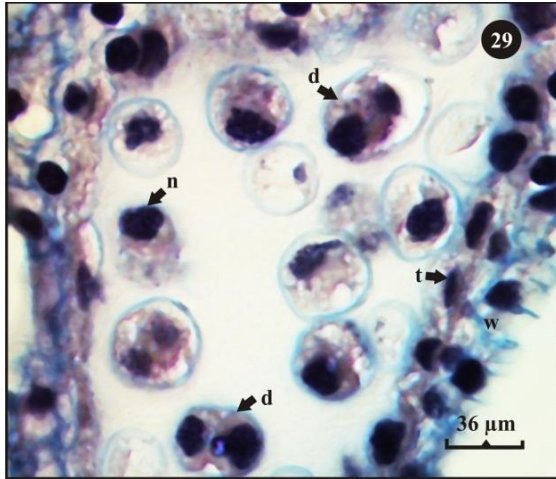
Figs. **21- 24.** Primeras etapas de la ontogenia del esporangio en *L. descendens*. **21.** Corte longitudinal del estróbilo en el cual se observa la maduración basípeta de los esporangios **22.** Células epidérmicas a partir de las cuales se formara el esporangio, localizadas en la base de los esporófilos. **23.** Desarrollo del esporangio y formación del estrato celular interno y el externo. **24.** Esporangio con pared y tejido esporógeno.

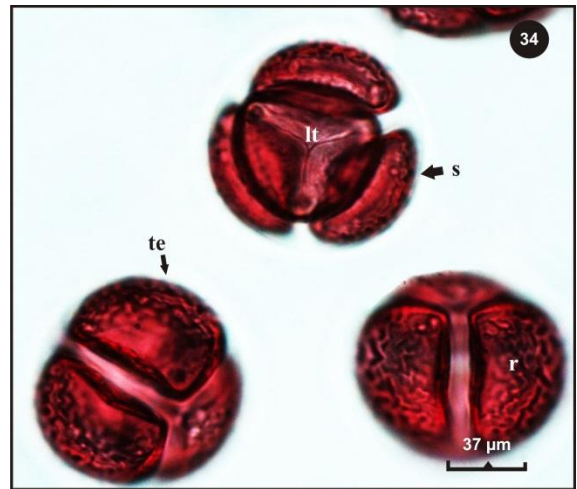
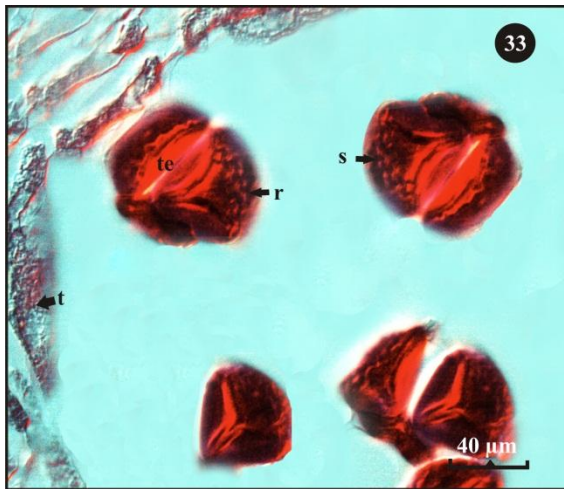
cb: canal basal de mucilago, ec: células epidérmicas, ei: estrato celular interno, ej: eje del estróbilo, ex: estrato celular externo, mt: mitosis, n: núcleo, sf: esporofilo, sr: esporangio, ts: tejido esporógeno, w: pared del esporangio.



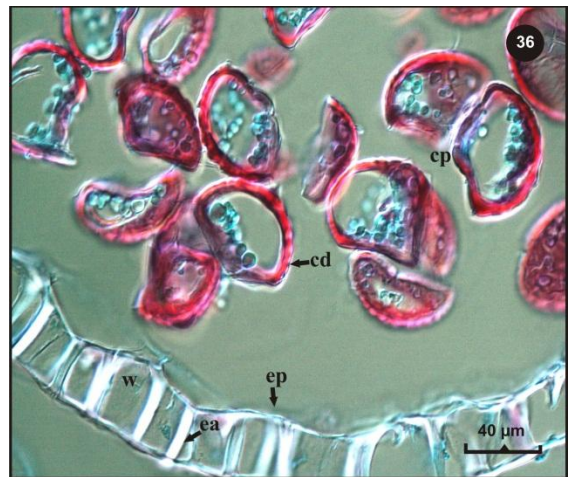
Figs. **25-28**. Tejiendo esporógeno y esporocitos de *L. descendens*. **25**. Tejiendo esporógeno coloreado con aceto-orceína láctica. **26-27**. Esporocitos premeióticos, envueltos por la cubierta del esporocito y el material refringente entre la cubierta del esporocito y la célula (montaje en fresco teñidos con aceto-orceína láctica y azul de Alcian, respectivamente). **28**. Esporangio diferenciado con esporocitos, tapete y células de la pared.

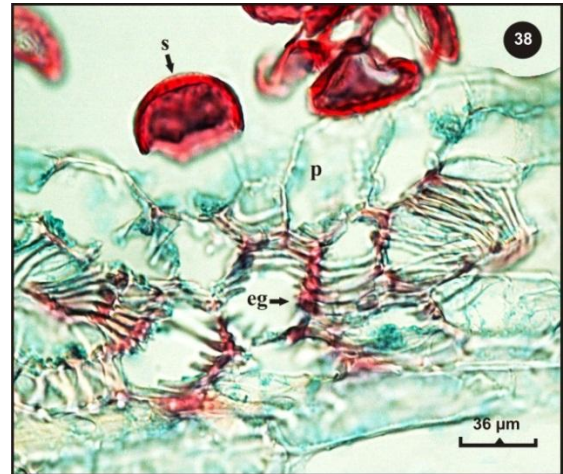
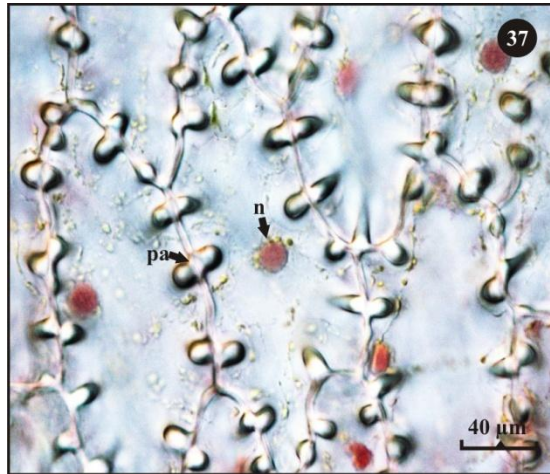
c: citoplasma, ce: cubierta del esporocito, n: núcleo, p: pedicelo, sr: material refringente, sp: esporocitos, t: tapete, ts: tejido esporógeno , w: pared del esporangio.





Figs. 29 - 34. Estado de díada y tétradas en diferentes etapas de maduración de *L. descendens*. 29. Estado de díada al final de meiosis I (montaje permanente coloreado reactivo de Azul de Alcian-Hematoxilina). 30 - 34 Tétradas en maduración. 30 - 32 - 34. Montajes en frescos coloreados con acetorceína láctica. 31 - 33. Cortes permanentes coloreados con Safranina O- fastgreen. Se observa el engrosamiento de las paredes y la formación del patrón de ornamentación rugulada de las paredes de las esporas. ce: cubierta del esporocito, d: díada, lt: lesura trirradiada, n: núcleo, r: ornamentación rugulada, s: espora, sr: material refringente, t: tapete, te: tétradas, w: pared del esporangio.





Figs. **35 - 38**. Degradación de los estratos de la pared del esporangio y el tapete, células de la pared del esporangio y células del pedicelo de *L. descendens*. **35**. Esporangio con esporas libres donde se observa remanentes de las células del tapete. **36**. Células de la pared definitiva del esporangio, se observa los engrosamientos anticlinales y periclinal interno y las esporas. **37**. Montaje en fresco de las células de la pared del esporangio coloreado con aceto-orceína láctica y visto en plano superficial. **38**. Células del pedicelo, se observa los engrosamientos alrededor del contorno celular.

cd: cara distal, cp: cara proximal, ea: engrosamiento anticlinal, eg: engrosamientos de las células del pedicelo, ep: engrosamiento periclinal, n: núcleo, p: pedicelo, pa: engrosamientos en forma de papilas en la pared del esporangio, r: ornamentación rugulada, s: spora, t: tapete, w: pared del esporangio.

### **3.3 Morfometría de algunas estructuras asociadas al esporangio y esporas de *L. cernua* y *L. descendens*.**

Los resultados de las medidas de *L. cernua* y *L. descendens* para la longitud del estróbilo, las tétradas, las células de la pared del esporangio, el pedicelo y las esporas, se observan en las tablas 1 y 2 respectivamente.

**Tabla 1.** Medidas de *L. cernua*.

<b>Medidas de <i>L. cernua</i> (<math>\mu\text{m}</math>; n = 30)</b>		<b>Medida mínima</b>	<b>Medida máxima</b>	<b>Media y desviación. estándar</b>
<b>Células de la pared del esporangio</b>	Engrosamiento periclinal	8.10	13.01	10.64 $\pm$ 1.35
	Engrosamiento anticlinal	7.00	10.85	8.53 $\pm$ 1.09
<b>Esporas</b>	Cara proximal (eje ecuatorial)	35.63	45.96	41.65 $\pm$ 2.89
<b>Pedicelo de esporangios maduros</b>	Ancho en posición sagital	209.40	222.30	212.58 $\pm$ 3.33
	Largo en posición sagital	97.65	106.90	103.06 $\pm$ 2.33
<b>Tétradas</b>	Posición lateral	57.41	71.25	66.09 $\pm$ 3.9
	Posición radial	70.41	79.63	75.37 $\pm$ 3.9

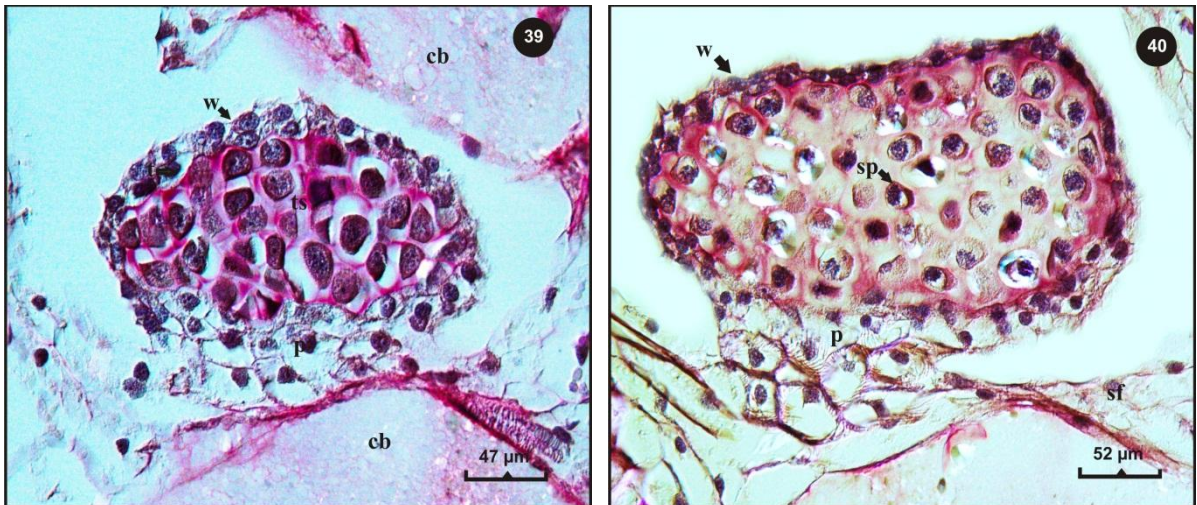
**Cuadro 2.** Medidas de *L. descendens*.

<b>Medidas de <i>L. descendens</i> (<math>\mu\text{m}</math>; n = 30)</b>		<b>Medida mínima</b>	<b>Medida máxima</b>	<b>Media y desviación. estándar</b>
<b>Células de la pared del esporangio</b>	Engrosamiento periclinal	10.00	14.85	12.67 $\pm$ 1.42
	Engrosamiento anticlinal	7.00	9.85	8.20 $\pm$ 0.80
<b>Esporas</b>	Cara proximal (eje ecuatorial)	42.10	46.45	44.59 $\pm$ 1.28
<b>Tétradas</b>	Posición lateral	74.35	81.24	77.69 $\pm$ 2.04
	Posición radial	74.12	79.63	77.03 $\pm$ 1.77
<b>Pedicelo de esporangios maduros</b>	Ancho en posición sagital	209.40	222.30	212.58 $\pm$ 3.33
	Largo en posición sagital	97.65	106.90	103.06 $\pm$ 2.33

### 3.4. Pruebas histoquímicas.

#### 3.4.1 Identificación de mucopolisacáridos con la coloración de ácido periódico de Schiff (PAS).

Durante la ontogenia de los esporangios y la esporogénesis de *L. cernua* y *L. descendens*, se observó la presencia de mucopolisacáridos, en diferentes etapas y estructuras. Durante las primeras etapas de diferenciación de los esporangios se observa la presencia de mucopolisacáridos en los canales basales de mucilago y en las células del tejido esporógeno, principalmente en el citoplasma y las paredes celulares, (Fig. 39). En esporangios más maduros se observa la presencia de mucopolisacáridos principalmente en la cavidad del esporangio (Fig. 40). A medida que los esporocitos maduran y forman las tétradas después de la meiosis, se observa que los mucopolisacáridos disminuyen progresivamente en la cavidad del esporangio. Posteriormente, en la etapa de tétradas maduras, la cavidad del esporangio no presenta mucopolisacáridos, y las paredes de las tétradas se colorean ligeramente con reactivo de Schiff (Fig. 41). En esporangios maduros, las paredes de las esporas presentan baja intensidad en la coloración pero las células de la pared del esporangio colorean intensamente. Así mismo, se observan abundantes gránulos PAS positivos en el citoplasma de las esporas (Fig. 42). En general, se observó que la coloración de PAS fue positiva para la mayoría de los tejidos presentes en el estróbil; esto se debe a que esta coloración tiñe lignina y todo tipo de polisacáridos incluyendo celulosa y almidón; por tal razón, se debe tener cuidado en la interpretación de los resultados.





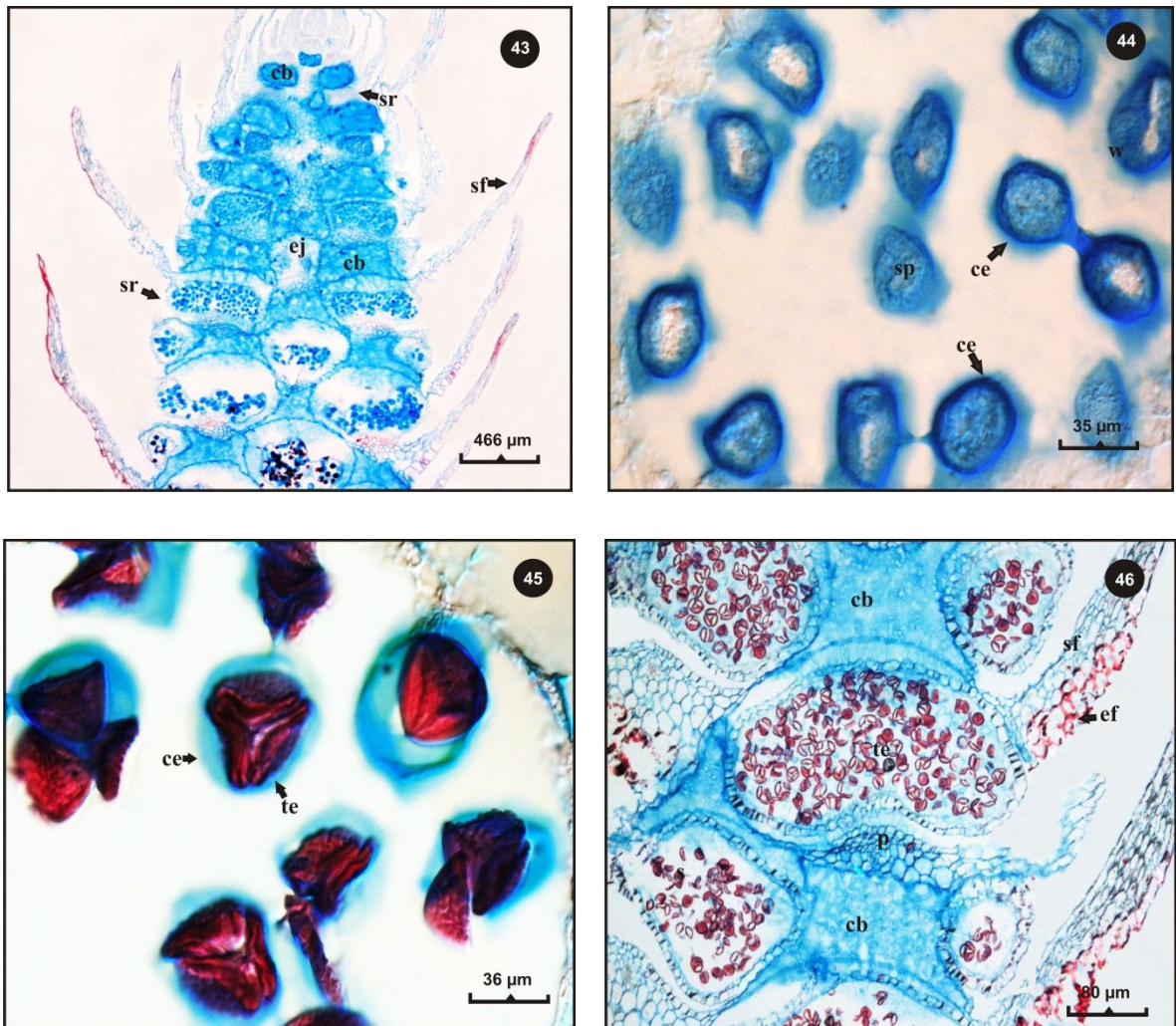
**Figuras 39-42.** Identificación de mucopolisacáridos durante la ontogenia de los esporangios y esporogénesis de *L. cernua* utilizando la tinción de PAS. **39.** Se observa la presencia de mucopolisacáridos en las células del tejido esporógeno. **40.** Acumulación de mucopolisacáridos en la cavidad del esporangio a medida que los esporangios maduran. **41-42.** Esporangios con tétradas maduras y esporas obsérvese la ausencia de mucopolisacáridos en la cavidad del esporangio.

cb: canal basal de mucilago, cd: cara distal, cp: cara proximal, ea: engrosamiento anticlinal, ep: engrosamiento periclinal, g: gránulos PAS positivos, n: núcleo, p: pedicelo, s: espora, sf: esporofilo, sp: esporocitos, t: tapete, te: tétradas, ts: tejido esporógeno, w: pared del esporangio.

### 3.4.2 Identificación de mucopolisacáridos sulfatados con la coloración de Azul de Alcian contrastado con Safranina O.

En los estróbilos de *L. cernua* y *L. descendens* se identificaron mucopolisacáridos sulfatos y carboxílicos, en los esporangios inmaduros y canales basales. Los mucopolisacáridos se acumulan en etapas tempranas de la ontogenia de los esporangios, espacios entre las células del tejido esporógeno y canales basales de mucilago. Así mismo, estos compuestos son abundantes en la cavidad del esporangio durante la formación de las tétradas y disminuyen progresivamente con la maduración del esporangio (Fig. 43). En los esporocitos premeióticos, se observa que la cubierta del esporocito es azul de Alcian positiva (Fig. 44). En contraste, las paredes de las esporas que conforman la tétrada se colorean con

safranina. (Fig. 45). En esporangios maduros es reducida la cantidad de estos mucopolisacáridos detectados en la cavidad esporangial (Fig. 46)



**Figuras 43-46.** Identificación de mucopolisacáridos sulfatados y carboxílicos durante la ontogenia de los esporangios y esporogénesis de *L. cernua* y *L. descendens* utilizando la tinción de azul de Alcian-safranina O. **43.** Mucopolisacáridos sulfatados y carboxílicos (color azul intenso), acumulados en las etapas iniciales de la ontogenia de los esporangios y en los canales basales de mucílago. **44 – 45.** Cubiertas del esporocito se coloreadas intensamente con azul de Alcian. **46.** Los canales de mucilago son azul de Alcian positivos mientras que las paredes de las esporas se colorean con safranina O.  
 cb: canal basal, ce: cubierta del esporocito, ef: engrosamiento abaxial del esporofilo, ej: eje del estróbilo, p: pedicelo, sf: esporofilo, sp: esporocito, sr: esporangio, te: tétradas

### 3.4.3 Identificación de calosa con la coloración de Azul de anilina, con microscopía de fluorescencia con filtro UV (Filtro de excitación 330-380 nm y filtro barrera 420 nm).

Las pruebas para calosa utilizando la coloración de azul de anilina fueron negativas para las dos especies de *Lycopodiella*. Los cortes permanentes sin azul de anilina (control) de esporas, tétradas y la pared del esporangio emitieron una coloración azul brillante (Fig. 47). Para los montajes con azul de anilina el comportamiento fue similar (Fig. 48).

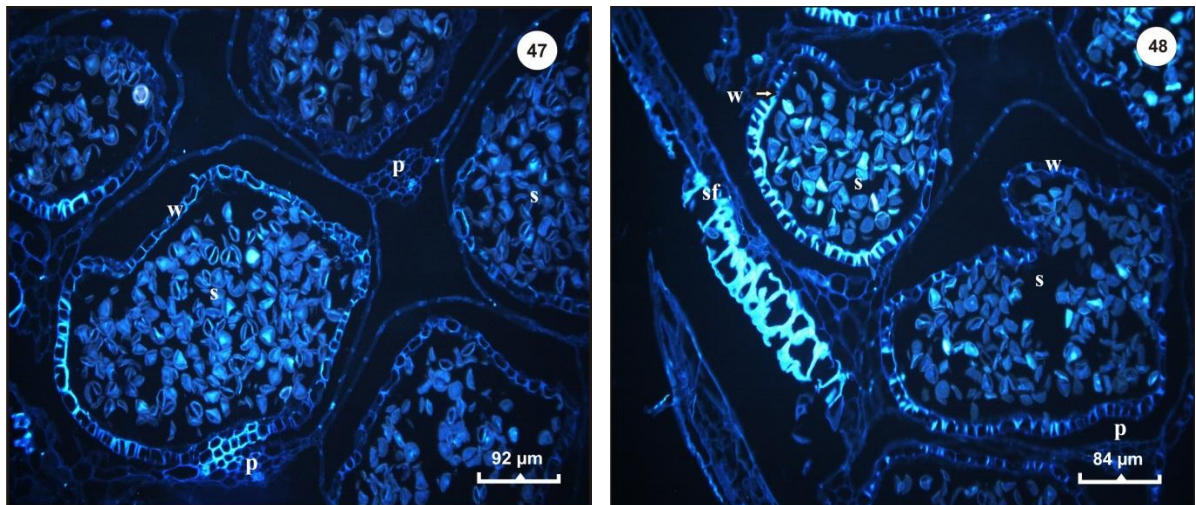


Fig. **47-48**. Fluorescencia de cortes permanentes de los esporangios de *L. cernua* utilizando filtro UV para la detección de calosa. **47**. Corte permanente en sección longitudinal del estróbilo de *L. cernua* sin teñir con azul de anilina. **48**. La misma sección del estróbilo de *L. cernua* teñido con azul de anilina. La emisión de un color azul brillante en los dos cortes es similar y por lo tanto no se detecta la presencia de calosa que en estas condiciones experimentales emite fluorescencia amarillo-verdoso.

p: pedicelo, s: esporas, sf: esporofilo, w: pared del esporangio.

## 4. DISCUSIÓN.

### Ontogenia y estructura

El desarrollo de los esporangios de *L. cernua* y *L. descendens* es basípeto, con esporangios maduros en la base del estróbilo y los inmaduros en la región apical; es decir, todas las etapas del desarrollo se pueden encontrar en un mismo

estróbilo maduro. Esta condición también fue señalada por Rolleri (1972 a-b) y Uehara & Kurita (1991) para *L. clavatum*, Bruce (1974) para *L. carolinianum*, Øllgaard (1987) para *Phylloglossum* y *Lycopodiella*, Rincón *et al.* (2009) para *Huperzia brevifolia* (Grev. & Hook.) Holub., Bravo *et al.* (en prep.)<sup>4</sup> para *H. tetragona* (Hook. & Grev.) Trevis., Gélvez *et al.* (en prep.)<sup>4</sup> para *L. clavatum* y *L. thyoides* Humb., Dorado *et al.* (en prep.)<sup>4</sup> para *H. phyllicifolia* (Desv. Ex Poir.) Holub. y Rincón *et al.* (en prep.)<sup>4</sup> para otras especies de *Huperzia* lo que sugiere alguna uniformidad en los géneros en cuanto a la ontogenia esporangial.

Rolleri (1972a), describió la morfología comparada de algunas especies de *Lycopodium*, incluidos detalles sobre la morfogénesis de los esporangios; así mismo, la autora determinó que las células epidérmicas localizadas sobre la cara adaxial de los esporófilos darán origen a los esporangios, los cuales se dividen periclinalmente para producir dos capas de células: una basal, que originará el pedicelo y otra superficial que originará la pared del esporangio y el tejido esporógeno. Posteriormente, el esporangio se diferencia y aumenta de tamaño por activas divisiones periclinales y anticlinales. Nuestros resultados en *L. cernua* y *L. descendens* también evidencian dichas observaciones. En especies no estrobiladas, dichos rasgos son similares, pero las células epidérmicas que dan origen a los esporangios se localizan en las axilas entre los micrófilos y el eje caulinar (Rolleri 1972a, Øllgaard 1987, Rincón *et al.* 2009).

Durante la ontogenia de los esporangios de *L. cernua* y *L. descendens*, se observó que los esporocitos se diferencian a partir del tejido esporógeno y presentan una cubierta que permanece durante todo el proceso de esporogénesis llamada cubierta del esporocito (“*sporocyte coat*”). Este término fue propuesto por Pettit & Jermy (1974), para designar la cubierta superficial que rodea los esporocitos de los pteridófitos en general. En *L. cernua*, *descendens* y otras especies de *Huperzia* y *Lycopodium* (en preparación citados anteriormente). Estas observaciones contrastan con las reportadas por Rincón *et al.* (2009) quienes argumentaron que en *H. brevifolia*, que la cubierta de los esporocitos desaparecía liberándolos en la cavidad esporangial, justo al inicio de la meiosis. Es posible que estas observaciones se deban a un artefacto de montaje producido por las técnicas empleadas durante la preparación del material. De esta manera, se concluye que la cubierta de los esporocitos en las licopodiáceas se mantiene durante todo el proceso de la esporogénesis.

---

<sup>4</sup> Referidos en preparación, citados anteriormente.

El tejido esporógeno en *L. cernua* y *L. descendens* se diferencia hasta la formación de los esporocitos premeióticos; este proceso se caracteriza por el hinchamiento y liberación de las células en el fluido de la cavidad esporangial, así como el aumento de gránulos refringentes en el citoplasma. Este proceso también ha sido registrado en otros licopodios como *H. brevifolia* (Rincón *et al.* 2009) y al parecer es un proceso general dentro de las licopodiáceas, caracterizado por el aumento de sustancias de reserva como el almidón y principalmente de sustancias de naturaleza lipídica que podrían intervenir en la formación del esporoderma.

En *L. cernua* y *L. descendens* el proceso de meiosis es simultáneo y por consiguiente, sin el desarrollo de una pared que separe los núcleos de la díada, una vez terminada la meiosis I. Este comportamiento es similar al observado en *H. brevifolia* (Rincón *et al.* 2009) y en otras licopodiáceas (en preparación citados anteriormente). Furness *et al.* (2002) determinaron que la meiosis simultánea es común en briófitos y pteridófitos. De igual forma, establecieron la relación de este tipo de división con los grupos de plantas que producen esporas triletes, en contraste, con los grupos de pteridófitos que producen esporas monoletes y que generalmente presentan división sucesiva. Estos autores señalan que la división simultánea se puede considerar un carácter ancestral y que la sucesiva ha surgido de manera independiente a lo largo del proceso evolutivo.

La formación de microtúbulos en disposición cuádrupolar ha sido relacionada con el fenómeno de monoplastidia que se presenta durante los procesos de mitosis y meiosis de la mayoría de las criptógamas (Brown & Lemmon 1990a; Brown & Lemmon 1990b; Brown & Lemmon 1991b; Brown & Lemmon 1992; Brown & Lemmon 1997). La principal característica del fenómeno, radica en que dos plastidios son los que inician el anclaje y el movimiento de los sistemas de microtúbulos del huso, y que en el caso de la meiosis determina la formación de una tétrada con esporas en disposición tetraédrica (Brown & Lemmon 1997; Pickett *et al.* 1999; Shimamura *et al.* 2004). En relación a los licófitos se ha determinado que las especies heterósporas (Brown & Lemmon 1984, 1985, 1987 y 1989; Cleary *et al.* 1992a-b) y las homósporas como *Lycopodium* (Uehara & Kurita 1991, Brown & Lemmon 1997) y *Lycopodiella* (Roy Brown comunicación personal) son monoplastídicas. Aunque el sistema cuádrupolar de microtúbulos, se relaciona con la monoplastidia, no es exclusivo, ya que se pueden encontrar grupos de plantas que sin presentar esta condición lo pueden desarrollar (Brown & Lemmon 2004). Sin embargo, al comparar dos especies monoplastídicas estrechamente relacionadas como es el caso de *Lycopodium* y *Lycopodiella*, no es claro por qué

este sistema de microtúbulos no fue encontrado en *L. cernua* y *L. descendens* a pesar de el gran número de montajes realizados.

Rolleri (1972a) observó, en diferentes especies de *Lycopodium*, que la pared del esporangio está formada inicialmente por seis a siete capas con células de citoplasma granular y grandes nucléolos; en el curso del desarrollo, el número de capas parietales se reduce a cuatro. En contraste en *L. cernua* y *L. descendens* solo se observaron de dos a tres capas: la más externa forma la pared definitiva del esporangio y la más interna, el tapete. Las capas intermedias se degradan junto con el tapete, a medida que madura el esporangio. Esta condición es similar a la encontrada en *L. clavatum* (Uehara & Kurita 1991) y *H. brevifolia* (Rincón *et al.* 2009).

El estrato celular externo de la pared del esporangio de *L. cernua* y *L. descendens* presenta engrosamientos lignificados en forma de “U”, característica descrita por Øllgard (1975) para las licopodiáceas en general. Estos engrosamientos se desarrollan a medida que el esporangio madura y le confieren resistencia para contener el número creciente de esporas, que solo serán liberadas cuando maduren. Así mismo, es posible que faciliten su liberación, actuando como un resorte en la dispersión de las esporas. Como ocurre en la mayoría de los helechos (Slosson 1906; Bierhost 1971; Moran 2004) y en Licófitos heterosporados como *Selaginella* P. Beauv. (Koller & Scheckler 1986; Webster 1995; Schneller *et al.* 2008). Sin embargo, poco se sabe de estos mecanismos en licopodiales. Rolleri *et al.* (2010), describe los engrosamientos de las células de la pared del esporangio de *L. cernua* y observa que estos son lignificados y presentan espesamientos que se depositan en forma de masas irregulares con forma papilar o mamilar, característica similar a la observada en *L. cernua* y *L. descendens*.

El tapete es un estructura que se relaciona con los procesos de esporogénesis en briófitos y pteridófitos y en la microporogénesis de gimnospermas y angiospermas. Los tipos más frecuentes son secretor o plasmodial (Parkinson & Pacini 1995; Furness *et al.* 2002; Furness 2008). En *L. cernua* y *L. descendens*, el tapete es de tipo secretor, se origina a partir de la capa celular interna de la pared del esporangio y se mantiene hasta que finalmente se degrada cuando las esporas alcanzan la madurez. Según Pacini & Frenchi (1993) el tapete contribuye con la generación de sustancias de reserva y con la formación de precursores biosintéticos del esporoderma y de la pared de los granos de polen (Lugardon 1990; Polowick & Sawhney 1993; Parkinson & Pacini 1995; Pacini 1997; Furness & Rudall 2001; Furness 2008); esta condición fue observada para *L. clavatum*

(Uehara & Kurita 1991), para *Huperzia brevifolia* (Rincón *et al.* 2009) y *L. clavatum* y *L. thyoides*. (Gelvez *et al.* en prep.). Teniendo en cuenta lo anterior, se podría indicar que existe uniformidad ontogenética en cuanto a la formación y función del tapete. Por consiguiente, se asume que el tapete de *L. cernua* y *L. descendens*, cumple con las mismas funciones encontradas en otros grupos de plantas.

Los esporangios de *L. cernua* y *L. descendens* no presentan vascularización, al igual que lo observado por Rincón *et al.* (2009) en *Huperzia brevifolia* y por Pita *et al.* (2006) en diez especies de *Huperzia* registradas para Brasil. No obstante, en *L. cernua* y *L. descendens* se observaron en el pedicelo células con engrosamientos helicoidales lignificados, similares a los presentes en el tejido xilemático aunque más cortas y con citoplasma funcional, por lo que la función de estas células como tejido de trasfusión, se pone en duda y probablemente solo actúe como soporte del esporangio, dada la posición de este en la región media-basal del esporofilo.

Las esporas de *L. cernua* y *L. descendens* son similares en el patrón de ornamentación rugulada en la cara distal y subrugulada en la cara proximal. Las esporas de *L. cernua* presenta congruencia en el patrón de ornamentación con lo propuesto en otros estudios (Tryon & Lugardon 1991, Tryon & Stolze 1994, Rolleri *et al.* 2010). Sin embargo, no se cuenta con referencias para la comparación de las esporas de *L. descendens*, ya que no se han realizados estudios sobre la morfología de éstas.

### **Morfometría.**

En la morfometría de *L. cernua* y *L. descendens*, las medidas de menor variación fueron los engrosamientos de las paredes anticlinales de los esporangios ( $\pm 1.09$  y  $\pm 0.80 \mu\text{m}$ , respectivamente). Estos datos merecen especial atención en posteriores estudios ya que hasta momento no se ha encontrado en la literatura información con qué contrastar. De la misma forma, merecen consideración, las medidas en promedio del eje ecuatorial de las esporas de *L. cernua* y *L. descendens*, que fueron de  $41.65 \pm 2.89 \mu\text{m}$  y  $44.59 \pm 1.28 \mu\text{m}$  respectivamente. Según lo anterior, la diferencia de las medidas de las esporas entre las especies objeto de estudio es solo de  $4 \mu\text{m}$ . En contraste, Tryon & Tryon (1982) indican que las medidas del eje ecuatorial de las esporas para *L. cernua* son en promedio  $\bar{x} = 35 \mu\text{m}$ . Así mismo, Rolleri *et al.* (2010) registraron que la medida del eje ecuatorial de las esporas de *L. cernua* es de  $\bar{x} = 30 \mu\text{m}$ . Los resultados obtenidos en el presente trabajo, muestran que las esporas de *L. cernua* y *L. descendens* presentan mayores tamaños que los reportados. Posiblemente estas diferencias en el tamaño se deban a que exista algún grado de variación que se ubica

claramente dentro de los límites de la especie. Basta con mencionar que cada esporangio produce aproximadamente 10.000 esporas (Moran 2004). Por otra parte, los factores ambientales, también pueden ser un factor de variación intraespecífica.

Finalmente, las medidas que presentaron mayor grado de variación en orden ascendente, fueron: largo y el ancho del pedicelo que sostiene el esporangio, ( $\pm 3.33$ , para las dos especies) y las tétradas en *L. cernua* ( $\pm 3.9$ ), estos resultados, limitan el empleo de estas características en taxonomía. Sin embargo, para hacer un mejor estimado del valor taxonómico de estos caracteres, sería importante realizar un estudio más amplio que incluya varias localidades en diferentes ambientes para tener una visión amplia de la eventual variación en tamaños relativos, tipos de esporodermo y viabilidad de las estructuras reproductivas (Cristina Rolleri, comunicación personal). Según los datos analizados hasta el momento, no existe suficiente soporte para diferenciar a *L. cernua* de *L. descendens* como entidades taxonómicas independientes. Sin embargo para dar mayor soporte a esta afirmación se hace necesario analizar otras características morfológicas como los patrones epidérmicos de esporofilos y esporangios que no son tan influenciados por factores ambientales.

### **Histoquímica.**

En *L. cernua* y *L. descendens* se observaron canales basales de mucílago de origen lisogénico. Canales similares fueron descritos por Bruce (1976) y Rolleri (1976) en algunas especies de *Lycopodiella* y *Lycopodium* y Ogura (1972) describe este tipo de canales en Marattiaceae. De acuerdo con Bruce (1976) y estudios recientes en *L. clavatum* y *L. thyoides* (Gélvez *et al.* en prep), los canales de mucílago encontrados en estas especies también presentan desarrollo lisogénico. Morán (2008) menciona se encuentra mucílago en algunas especies de helechos arborescentes de la familia Cyatheaceae. El mucílago encontrado en estos canales es azul de Alcian positivo, lo que indica que están constituidos principalmente por mucopolisacáridos sulfatados y carboxílicos. Bruce (1976) indica que estos mucílagos, pueden tener varias funciones en el estróbilo de las licopodiáceas, de las cuales la más importante, es la retención de agua para favorecer el desarrollo de esporangios y protegerlos de la desecación. Dado el comportamiento del mucílago presente en estos canales para *L. cernua* y *L. descendens*, se podría asumir que la principal función de los mucílagos en estas especies es evitar la desecación de aquellas células más susceptibles a la deshidratación, durante las etapas tempranas de la esporogénesis, ya que en otras especies de plantas estas sustancias cumplen una función similar (Bruce

1976; Pacheco *et al.* 2003; Majdoub *et al.* 2010; Ghanem *et al.* 2010). La resistencia de las esporas maduras a la desecación y la capacidad de entrar en dormición, podrían soportar esta idea.

El comportamiento de los mucopolisacáridos neutros, sulfatados y carboxílicos durante la ontogenia de los esporangios y la esporogénesis de *L. cernua* y *L. descendens* es similar y congruente con el encontrado para otras licopodiáceas (en preparación citados anteriormente). Uehara & Kurita (1991) y Rincón *et al.* (2009) proponen que el paso de las sustancias desde el tapete a las esporas en formación, se podría dar a través del fluido presente en el cavidad del esporangio. Estos mucílagos podrían funcionar como biopolímeros retenedores de agua, capaces de mantener un ambiente acuoso a través del cual las sustancias de reserva o precursores de la pared de las esporas, serían exportados desde el tapete hasta las estructuras de disposición final. Así mismo, la retención de agua por el mucílago, protegería a las células del tejido esporógeno, esporocitos y tétradas inmaduras de la desecación. Una vez, el esporoderma se consolida, el mucílago en la cavidad esporangial desaparece, lo cual permite que las esporas maduras se sequen y sean liberadas del esporangio.

La calosa es un compuesto importante durante la microsporogénesis ya que ayuda a formar la exina y por consiguiente en la maduración y formación de las paredes de los granos de polen (Takahashi 1986; Takahashi 1988, Zhang *et al.* 2002, Meier-Melikyan *et al.* 2003, Teng *et al.* 2005, Anger & Weber 2006, Blackmore 2007, Blackmore *et al.* 2007). La presencia de este compuesto en el proceso de esporogénesis de las criptógamas es incierta y ha sido registrada solo en algunas hepáticas y helechos (Brown & Lemmon 1990). Long (2003) determinó que la calosa está ausente durante el proceso de esporogénesis en anthocerotes. Esta condición es similar para *L. cernua* y *L. descendens*, así como, en otras licopodiáceas (en preparación, citados anteriormente). Por consiguiente, la similitud de los patrones de fluorescencia entre los controles y los tratamientos con azul de anilina obtenidos durante el proceso de esporogénesis en estas dos especies bajo luz ultravioleta, se explicaría por la autofluorescencia emitida por las sustancias que conforman la pared de las esporas en formación como la lignina, que presenta emisión azul brillante o azul-verdoso (Rost 1995, Ruzin 1999, Rolleri & Prada 2004).

## 5. CONCLUSIONES

En *L. cernua* y *L. descendens* es posible observar el desarrollo de los esporangios en un solo estróbilo debido a que estos maduran de forma gradual a lo largo de éste, es decir es basípeta; como lo encontrado para otras especies de Lycopodiaceae, lo que sugiere una uniformidad en cuanto a la ontogenia esporangial, situación que posiblemente se deba a que el desarrollo de caracteres reproductivos en licopodiáceas se encuentran ampliamente conservados.

La cubierta de los esporocitos de *L. cernua* y *L. descendens* se conserva durante todo el proceso de la esporogénesis y solo se pierde en el momento en el que maduran las tétradas y se liberan las esporas en la cavidad esporangial, situación encontrada en otras licopodiáceas.

La disposición cuadripolar de los microtúbulos no se observó durante la meiosis de *L. cernua* y *L. descendens* a pesar de ser una especie monoplastídica. Sin embargo, en otras especies de licopodiáceas con división monoplastídica se observó este fenómeno, lo cual sugiere que este proceso no es exclusivo en plantas que presenten este tipo de división.

El comportamiento de las medidas morfométricas tomadas fue similar para *L. cernua* y *L. descendens*, aunque demostró ciertas diferencias con medidas realizadas en otros estudios. Estas variaciones en las medidas pueden deberse a factores ambientales y diferencias intra-específicas en la morfología de algunas estructuras.

El desarrollo de canales de mucilago en *L. cernua* y *L. descendens*, son de tipo lisogénico. Los mucilagos presentes en estos canales y en la cavidad del esporangio posiblemente retengan agua en etapas de la esporogénesis susceptibles a la desecación.

Durante la esporogénesis, se detectó la presencia de mucopolisacáridos, los cuales cumplen un papel importante durante el proceso de la esporogénesis ya que posiblemente actúan como biogeles para ayudar a la retención de agua y

evitar la desecación, proporcionarían un medio acuoso para el transporte de sustancias nutritivas y precursores que intervienen en la formación del esporodermo que provienen del tapete y como sustancias de reserva en esporas maduras.

Los resultados para la detección de la calosa fueron negativos para *L. cernua* y *L. descendens*, indicando que este compuesto no interviene en la génesis de las paredes de las esporas, como se ha documentado para los granos de polen.

## 6. RECOMENDACIONES

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se hace necesario fomentar la elaboración de más trabajos sobre la ontogenia de los esporangios y la esporogénesis en Licófitos y de esta forma entender con mayor profundidad los procesos de evolución de este antiguo grupo de plantas.

Deben realizarse estudios estructurales, ultraestructurales e histoquímicos que permitan detallar procesos cruciales durante la evolución de las plantas, que traten de dar respuesta a los siguientes interrogantes:

¿Los esporocitos de los cuatro géneros de Lycopodiales son monoplastídicos o poliplastídicos?

¿La ontogenia y ultraestructura del esporoderma es igual en los cuatro géneros?

¿Cuál es el comportamiento de las proteínas y otras moléculas orgánicas durante el proceso de esporogénesis en estos grupos?

## BIBLIOGRAFIA

- ANGER, E. & M. WEBER. 2006. Pollen-wall formation in *Arum alpinum*. *Ann. Bot.* 97: 239–244.
- BATEMAN, R. M., W. A. DIMICHELE & D. A. WILLARD. 1992. Experimental cladistic analysis of anatomically preserved arborescent lycopoids from the Carboniferous of Euramerica: an essay on paleobotanical phylogenetics. *Ann. Missouri. Bot. Gard.* 79: 500-559.
- BIERHORST, D. W. 1971. *Morphology of vascular plants*. The Macmillan Company. Nueva York.
- BILDERBACK, D.E. 1987. Association of mucilage with the ligule of several species of *Selaginella*. *Amer. J. Bot.* 74: 1116-1121.
- BLACKMORE, S. 2007. Pollen and spores: Microscopic keys to understanding the earth's biodiversity. *Plant. Syst. Evol.* 263: 3-12.
- BLACKMORE, S., A.H. WORTLEY, J.J. SKVARLA, J.R. ROWLEY. 2007. Pollen wall development in flowering. *New Phytol.* 3: 483-498.
- BROWN, R. C, & B. E. LEMMON. 1984. Plastid apportionment and preprophase microtubule bands in monoplastidic root meristem cells of *Isoetes* and *Selaginella*. *Protoplasma.* 123: 95-103.
- BROWN, R.C. & B. E. LEMMON. 1985. A cytoskeletal system predicts division plane in meiosis of *Selaginella*. *Protoplasma* 127: 101-109.
- BROWN, R. C, & B. E. LEMMON. 1987. Division polarity, development, and configuration of microtubule arrays in bryophyte meiosis. I. Meiotic prophase to metaphase I. *Protoplasma* 137:84-99.
- BROWN, R.C. & B. E. LEMMON. 1989. Morphogenetic plastid migration and microtubule organization during megasporogenesis in *Isoetes*. *Protoplasma* 152: 136-147.
- BROWN, R. C. & B. E. LEMMON. 1990a. Sporogenesis in bryophyta: p. 56-94. *In* S. Blackmore & R.B. Knox (eds). *Microspores: Evolution and ontogeny*. Academic Press, Londres, U.K.
- BROWN, C. R. & B. E. LEMMON. 1990b. Monoplastidic cell division in lower land plants. *Amer. J. Bot.* 77: 559-571.

- BROWN, R. C. & B. E. LEMMON. 1991. Plastid polarity and meiotic spindle development in microsporogenesis of *Selaginella*. *Protoplasma* 161:168-180.
- BROWN, R. C. & B. E. LEMMON. 1992. Polar organizers in monoplastidic mitosis of hepatics (Bryophyta). *Cell Motil. Cytoskel.* 22: 72-77.
- BROWN, R. C. & B. E. LEMMON. 1997. The quadripolar microtubule system in lower land plants. *J. Plant. Res.* 110: 93-106.
- BROWN, R. C. & B. E. LEMMON. 2004.  $\gamma$ -Tubulin, microtubule arrays, and quadripolarity during sporogenesis in the hepatic *Aneura pinguis* (Metzgeriales). *J. Plant Res.* 117: 371-376.
- BRUCE, J. G. 1974. Comparative studies in the biology of *Lycopodium carolinianum*. *Amer. Fern J.* 66: 125-137.
- BRUCE, J. G., 1976. Development and distribution of mucilage canals in *Lycopodium*. *Amer. J. Bot.* 63: 481-491.
- CLEARY, A.L., BROWN, R.C. & B. E. LEMMON. 1992a. Establishment of division plane and mitosis in monoplastidic guard cells of *Selaginella*. *Cell Motil. Cytoskel.* 23: 89-101.
- CLEARY, A.L., BROWN, R.C. & B. E. LEMMON. 1992b. Microtubule arrays during mitosis in monoplastidic root tip cells of *Isoetes*. *Protoplasma* 167: 123-133.
- DIMICHELE, W. A. & J.A SKOG. 1992. The Lycopsidea: a symposium, *Ann. Missouri. Bot. Garden.* 79: 447-449.
- DONG, X., HONG, Z., SIVARAMAKRISHNAN, M., MAHFOUZ, M. & D.P VERMA. 2005. Callose synthase (CalS5) is required for exine formation during microgametogenesis and for pollen viability in *Arabidopsis*. *Plant J.* 42: 315-328.
- FURNESS, C. A. & P.J RUDALL. 2001. The *tapetum* in basal angiosperms: Early diversity. *Int. J. Pl. Sci.* 162: 375-392.
- FURNESS, C.A., P.J. RUDALL & B. F. SAMPSON. 2002. Evolution of microsporogenesis in angiosperms. *Int. J. Pl. Sci.* 163: 235-260.
- FURNESS, C. A. 2008. A review of the distribution of plasmodial and invasive tapeta in eudicots. *Int. J. Pl. Sci.* 169: 207-223.

- GENSEL, P.G. 1992. Phylogenetic relationships of the zosterophylls and lycopsids: evidence from morphology, paleoecology, and cladistic methods of inference. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 79: 450-473.
- GHANEM, M.E., R. HAN, B. CLASSEN, J. QUETIN-LECLERQ, J.G. MAHY, C. RUAN, P. QIN, F. PEREZ & S. LUTTS. 2010. Mucilage and polysaccharides in the halophyte plant species *Kosteletzkya virginica*: Localization and composition in relation to salt stress. *J Plant Physiol.* 167: 382-392.
- GRAHAM, E. T. & P. A. JOSHY. 1995. Novel fixation of plant tissue, staining through paraffin with Alcian blue and hematoxylin and improved slide preparation. *Biotechnic & histochemistry.* 7: 263-266
- GRAUVOGEL-STAMM, L. & B. LUGARDON. 2009. Phylogeny and evolution of the horsetails: Evidence from spore wall ultrastructure. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 156: 116-129.
- IBARS, A., VILAR, M., IRANZO, J., & A. SALVO. 1988. Sobre la distribución del almidón en las Lycopodiales. *Acta Botánica Malacitana.* 13: 141-150.
- JENSEN, W.A. 1962. *Botanical histochemistry. Principles and practice.* Freeman, San Francisco, California, USA.
- JOHRI, B.M. 1984. *Embryology of angiosperms.* Springer, Berlin.
- JOHANNES ML, KLESSEN C. 1984. Alcianblue/PAS or PAS/Alcianblue? Remarks on a classical technique used in carbohydrate histochemistry. *Histochemistry* 80: 129 -132.
- JOHANSEN, D. A. 1940. *Plant microtechnique.* McGraw-Hill. Nueva York, USA.
- KAPLAN, D.R. 2001. The science of plant morphology: definition, history, and role in modern biology. *Amer. J. Bot.* 88: 1711-1741.
- KENRICK, P. & P. R. CRANE. 1997. *The origin and early diversification of land plants: a cladistics study.* Smithsonian Institution Press. Washington, D.C.
- KOLLER, A. L. & S. E. SCHECKLER. 1986. Variations in microsporangia and microspore dispersal in *Selaginella*. *Amer. J. Bot.* 73: 1274-1288.
- LONG, J. A. 2003. Ultrastructure and cytochemistry of sporogenesis in two bryophytes, *Notothylas* and *Takakia*. Tesis de maestría, Universidad Carbondale.

- LYON, H., M.R. BARER, & E. SCHULTE. 1991. Staining involving covalent bonds. *In Theory and Strategy in Histochemistry*. H. Lyon, ed. Berlin. Londres, U.K.
- LU, S.Y., LI, Y.F., CHEN, Z.K. & J. X. LIN. 2003. Pollen development in *Picea asperata* Mast. *Flora* 198, 112-117.
- LUGARDON, B. 1990. Pteridophyte sporogenesis: a survey of spore wall ontogeny and fine structure in a polyphyletic plant group. p. 95-120. *In Blackmore, S & R.B. Knox (eds). Microspores: Evolution and ontogeny*. Academic Press, Londres, U.K.
- MAJDOUB, H., L. PICTON, D. LE CERF & S. ROUDESLI. 2010. Water Retention Capacity of Polysaccharides from Prickly Pear Nopals of *Opuntia Ficus Indica* and *Opuntia Litoralis*. *J Polym Environ* 18: 451-458.
- MEIER-MELIKYAN, N.R., GABARAEVA, N.I., POLEVOVA, S.V., GRIGOR'EVA, V.V., KOSENKO, Y.V. & M.V. TEKLEVA. 2003. Development of pollen grain walls and accumulation of sporopollenin. *Russ J Plant Physiol*. 50:330-338.
- MORAN, R. C. 2004. A natural history of ferns. Timber Press, Portland, Oregon, EEUU.
- MORAN, R. C. 2008. Diversity biogeography and floristics. p. 367-393. *In Ranker, T. A & C, H. Haufler (eds). Biology and Evolution of Ferns and Lycophytes*. Cambridge University Press. New York.
- MORAN R.C. & R. RIBA. 1995. en Davidse, G. D.; Sousa, M. & S. Knapp (eds.), *Flora Mesoamericana, Psilotaceae a Salviniaceae, México, Tomo I*.
- MURILLO, M. T. & M. HARKER. 1990. Helechos y plantas afines de Colombia. *Acad. Colomb. Cienc. Exac. Fis. Nat. Colección Jorge Álvarez Lleras*. 12. Bogotá, Colombia.
- MURILLO, M.T. & J. MURILLO. 1999. Pteridófitos de Colombia I. Composición y distribución de las lycopodiaceae. *Rev. Acad. Col. Ciencias*. XXIII: 19-38.
- OGURA, Y. 1972. *Comparative Anatomy of the Vegetative Organs of Pteridophyta*. Gebrüder Borntraeger. Berlin, Germany.
- ØLLGAARD, B. 1975. Studies in Lycopodiaceae I. Observations on the structure of the sporangium wall. *Amer. Fern J*. 65: 19-27.
- ØLLGAARD, B. 1987. A revised classification of the Lycopodiaceae. *Lat. Opera Bot*. 92: 153-178.

- ØLLGAARD, B. 1988. Lycopodiaceae. In G. Harling & L. Andersson (eds). Flora of Ecuador. No. 33 Arlöv Berlings. Quito, Ecuador.
- ØLLGAARD, B. 1992. Neotropical Lycopodiaceae-an overview. Ann. Mo. Bot. Gard. 79: 687-717.
- ØLLGAARD, B. 1996. Neotropical *Huperzia* (Lycopodiaceae) distribution of species richness, p. 93-100. In J.M. Camus, M. Gibby & R.J. Johns (eds). *Pteridology in Perspective*. Royal Botanic Gardens, Kew, U.K.
- PACHECO, L., S. M. MOCIÑO, D. S. PUENTE & B. GRANADOS. 2003. Estructuras mucilaginosas en helechos y plantas afines con énfasis en el género *Diplazium* (Woodsiaceae). Contactos 48: 56-60.
- PACINI, E. 1997. Tapetum character states: analytical keys form tapetum types and activities. Can. J. Bot. 75: 1448-1459.
- PACINI, E. & G. FRENCHI. 1993. Role of the tapetum in pollen and spore dispersal. Plant Syst. Evol. 7: 1-11.
- PARKINSON, B.M & E. PACINI. 1995. A comparison of tapetal structure and function in pteridophytes and angiosperms. Plant Syst. Evol. 198: 55-88.
- PEARSE, A.G.E. 1985. Histochemistry. Theoretical and Applied. Vol.2. Analytic technology, 4<sup>th</sup> ed. Churchill Livinstone, New York, USA.
- PEEL, M.D., CAEMAN, J.G. & O. LEBLANC. 1997. Megasporocyte callose in apomictic buffelgrass, Kentucky bluegrass, *Pennisetum squamulatum* Fresen, *Tripsacum* L., and weeping Lovegrass. Crop Sci. 37:724-732.
- PETTITT, J. M & A.C JEREMY. 1974. The surface coats on spores. Biol. J. Linn. Soc. Lond. 6: 245-257.
- PITA, P., N. DE MENEZES & J. PRADO. 2006. Morfología externa e interna das folhas vegetativas, esporofilos e esporângios de espécies de *Huperzia* Bernh. (Lycopodiaceae-Pteridophyta) do Brasil. Rev. Bras. Bot. 29: 115-131.
- PICKETT, H., J.D., GUNNING, B.E., BROWN, R. C., LEMMON, B.E. & A. L. CLEARY. 1999. The cytoplasm concept in dividing plant cells: cytoplasmic domains and the evolution of spatially organized cell division. Amer. J. Bot. 86: 153-172.

- POLOWICK, P.L. & V. K. SAWHNEY. 1993. Differentiation of the tapetum during microsporogenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) with special reference to the tapetal cell wall. *Ann. Bot.* 72: 595-905.
- PRENTØ, P., M.R. BARER, H. LYON, & E. HASSELAGER. 1991. Staining of macromolecules on the basis of charge. *In Theory and Strategy of Histochemistry*. H. Lyon, ed. Berlin, Germany.
- RAMÍREZ, P.B.R & D. J.P MACÍAS. 2007. Catálogo de helechos y plantas afines del departamento del Cauca. Universidad del Cauca, Popayán.
- RENZAGLIA, K.S., R.J. DUFF, D.L. NICKRENT & D.J. GARBARY. 2000. Vegetative and reproductive innovations of early land plants; implications for a unified phylogeny. *Philos Trans Ser B.* 355: 769-793.
- RINCÓN, B. E. J., GÉLVEZ, L. L.V., FORERO, H. G., ARRIETA, P. D & J, S. HLEAP. 2009. Ontogenia del esporangio y esporogénesis del licopodio *Huperzia brevifolia* (Lycopodiaceae) de las altas montañas de Colombia. *Rev. Biol. Trop.* 57: 1141-1152.
- RODRÍGUEZ, D.W. 2002. Helechos, licopodios, selaginelas y equisetos del Parque Regional Arvi. CORANTIOQUIA, Medellín.
- ROLLERI, C.H. 1971. Dos nuevas especies de *Lycopodium* (Lycopodiaceae-Pteridophyta) para el noroeste argentino. *Darwiniana* 16: 133-139.
- ROLLERI, C.H. 1972a. Morfología comparada de las especies de "*Lycopodium*" (Pteridophyta-Lycopodiaceae) para el noroeste argentino. *Rev. Mus. La Plata.* 12: 223-317.
- ROLLERI, C.H. 1972b. Sobre la presencia y naturaleza de la endodermis en especies de *Lycopodium* L. s. str. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 14: 365-369.
- ROLLERI, C.H. 1974. Morfología de *Lycopodium fuegianum* Roivanen, Lycopodiaceae- Pteridophyta. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 15: 365-383.
- ROLLERI, C.H. 1975. A new species of *Lycopodium* L. from the Peruvian Andes. *Amer. Fern J.* 65: 3-6.
- ROLLERI, C.H. 1976. Acerca de los conductos glandulares en hojas de *Lycopodium alopecuroides* L. Lycopodiaceae-Pteridophyta. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 16: 397-405.

ROLLERI, C.H. 1977a. Correlation of morphology and geographical distribution in *Lycopodium saururus* Lam. Amer. Fern Journal 67: 109-120.

ROLLERI, C.H. 1977b. Estudios morfológicos y sistemáticos en la sección *Crassistachys* Herter del género *Lycopodium* L. *L. crassum* Humb.& Bonpld. Ex Willd. y *L. saururus* Lam. Rev. Mus. La Plata, Obra del Centenario III (Botánica): 97-110.

ROLLERI, C.H. 1978. Dos nuevas especies de *Lycopodium* L. para los Andes tropicales. Hickenia 1: 142-148.

ROLLERI, C.H. 1979. Análisis morfológico y revisión sistemática de las especies andino patagónicas del género *Lycopodium* L., Lycopodiaceae-Pteridophyta. Buenos Aires, Argentina. Physis. 95: 39-62.

ROLLERI, C.H. 1980. Estudios morfológicos y sistemáticos en la sección *Crassistachys* Herter del género *Lycopodium* L. *L. brevifolium* Hook. & Grev. y *L. rufescens* Hook. Bol. Soc. Argent. Bot. 19: 243-254.

ROLLERI, C.H. 1981. Sinopsis de las especies de *Lycopodium* L. (Lycopodiaceae Pteridophyta) de la sección *Crassistachys* Herter. Rev. Mus. La Plata, n. s. Bot. 12: 61-114.

ROLLERI, C.H. 1982a. El número cromosómico *Lycopodium saururus* Lam. (Lycopodiaceae-Pteridophyta) y sus implicancias sistemáticas. Rev. Mus. La Plata, n. s. Bot. 13: 115-118.

ROLLERI, C.H. 1982b. El número cromosómico de *Lycopodium clavatum* L. subsp. *clavatum* (Lycopodiaceae-Pteridophyta) y sus implicancias sistemáticas. Rev. Mus. La Plata, n. s. Bot.13: 119-122.

ROLLERI, C.H. 1984. Notas nomenclaturales y taxonómicas en la sección *Crassistachys* Herter del género *Lycopodium* L.: *L. cruentum* Spring. Rev. Mus. La Plata, n. s.. Bot. 14: 45-63.

ROLLERI, C.H. 1985a. Notas nomenclaturales y taxonómicas en la sección *Crassistachys* Herter del género *Lycopodium* L., II. Rev. Mus. La Plata N. S. Bot. 14: 1-9.

ROLLERI, C.H. 1985b. Estudios morfológicos y sistemáticos en la sección *Crassistachys* Herter del género *Lycopodium* L. Rev. Mus. La Plata, n. s. Bot. 13:189-196.

- ROLLERI, C.H. 1989. *Huperzia recurvifolia* Rolleri (Huperziaceae-Roth., Pteridophyta), una nueva especie de Brasil. Rev. Mus. La Plata, n. s. Bot. 21: 209-213.
- ROLLERI, C. H. 2008. Lycopodiaceae. En: F. O. Zuloaga, O. Morrone & M. J. Belgrano (Eds.), Catálogo de las plantas vasculares del Cono Sur (Argentina, S de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay: 84-96. Monogr. Syst. Bot. Mo. Bot. Gard. 107. Missouri, Botanical Garden Press, Saint Louis, Missouri.
- ROLLERI, C.H. & A. DEFERRARI. 1986. Modelos epidérmicos y otros caracteres foliares en la sistemática y ecología de *Lycopodium* L., sección *Crassistachys* Herter. Rev. Mus. La Plata N. S. Bot. 14: 65-87.
- ROLLERI, C.H. & A.M. DEFERRARI. 1989. Nota sobre la transferencia de especies del género *Lycopodium* L. (Lycopodiaceae-Mirbel) al género *Huperzia* Bernh. (Huperziaceae Roth.). Rev. Mus. La Plata N. S. Bot. 2: 151-157.
- ROLLERI, C.H. & E.R. DE LA SOTA. 1972. Sobre la presencia de *Lycopodium magellanicum* (Pal. Beauv.) Sw. en el noroeste de Argentina. Bol. Soc. Argent. Bot. 14:198-202.
- ROLLERI, C. & PRADA, C. 2004. Endodermis foliares en el género *Isoetes* L. (Isoetaceae). Acta Botanica Malacitana 29: 191-201.
- ROLLERI, C. H., PRADA, C. & MARTÍNEZ, O. G. 2010. *Huperzia reflexa* y *Lycopodiella cernua* (Lycopodiales - Pteridophyta): dos nuevas citas para el NO de la Argentina y actualizaciones sobre su morfología. Botanica Complutensis. 34: 41-48.
- ROST, F.W. 1995. Fluorescence microscopy. Vol II. Cambridge. University Press.
- RUZIN, S. E. 1999. Plant microtechnique and microscopy. Oxford University, NuevaYork, EEUU.
- SANTA, J. 1986. Anatomía del tallo y suscripción genérica en Lycopodiaceae. Actual. Biol. 15: 102-116.
- SANTA, J. 1989. Estudio sobre la distribución de algunas licopodíneas de Colombia. Actual. Biol. 18: 95-103.
- SCHNEIDER, H., SMITH, A. R., CRANFILL, R., HILDEBRAND, T. E., HAUFLER, C. H. & T.A RANKER. 2004. Unraveling the phylogeny of polygrammoid ferns

(Polypodiaceae and Grammitidaceae): exploring aspects of the diversification of epiphytic plants. *Molec. Phylog. Evol.* 31: 1041-1063.

SHIMAMURA, M., BROWN, R. C., LEMMON, B. E., AKASHI, T., MIZUNO, K., NISHIHARA, N., TOMIZAWA, K-I., YOSHIMOTO, K., DEGUCHI, H., HOSOYA, H., HORIO, T. & Y. MINEYUKI. 2004.  $\gamma$ -Tubulin in basal land plants: characterization, localization and implication in the evolution of acentriolar microtubule organizing centers. *Plant Cell* 16:45-59.

SIKES, M.G. 1908. Notes on the morphology of the sporangium- bearing organs of the lycopodiaceae. *New Phytol.* 7: 41-60.

SCHNELLER, J., H. GERBER & A. ZUPPIGER. 2008. Speed and force of spore ejection in *Selaginella martensii*. *Bot Helv.* 118:13-20.

SLOSSON, M. 1906. How ferns grow. Henry Holt & Co, Nueva York.

SOLÉ DE PORTA, N. & M.T. MURILLO-PULIDO. 2005. Estudio palino-botánico de algunas especies de Pteridophyta de Colombia. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 29: 183-218.

STANLEY, R.G. & H. F. LINSKENS. 1974. Pollen: Biology, Biochemistry, Management. New York: Springer

STEEDMAN, H.F. 1950. Alcian blue 8GS: a new stain for mucin. *Quart.J. Micro, Soc.* 91: 477-479.

TAKAHASHI, M. 1986. Microsporogenesis in a parthenogenetic species, *Houttuynia cordata* Thunb. (Saururaceae). *Bot Gaz.* 147:47-54.

TAKAHASHI, H. 1988. Ontogenetic development of pollen tetrads of *Drosera capensis* L. *Bot Gaz.* 149: 275-282.

TARDIEU-BLOT, M. L. 1971. Lycopodiacées (Lycopodiaceae), 13 p. 8-9. *In* Keraudren-Aymonin, M. Flore de Madagascar et des Comores, familles 13 et 13 bis. Museum National d'Histoire Naturelle. Paris, Francia.

TENG, N., Z. HUANG, X. MU, B. JIN, Y. HU & J. LIN. 2005. Microsporogénesis and pollen development in *Leymus chinensis* with emphasis on dynamic changes in callose deposition. *Flora* 200: 256-263.

- THOMAS, B. A. 1992. Paleozoic herbaceous lycopsids and the beginnings of extant *Lycopodium* sens. lat. and *Selaginella* sens. lat. Ann. Missouri Bot. Garden 79: 623-631.
- TOMESCU, A. 2009. Megaphylls, microphylls and the evolution of leaf development. Trends Plant Sci. 14: 5-12.
- TOURSARKISSIAN, M. 1971. Las lycopodiaceae del noroeste de Argentina estudio sistemático y anatómico. Ann. Acad. Bras. Ciencias. 43: 191-207.
- TRAVERSE, A. 2007. Paleopalynology. Second Edition. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- TRYON, R. & A. TRYON. 1982. Ferns and allied plants with special reference to tropical America. Springer, Nueva York, EEUU.
- TRYON, A.F. & B. LUGARDON. 1991. Spores of the Pteridophyta: surface, wall structure, and diversity based on electron microscope studies. Springer-Verlag, New York. USA.
- TRYON, R.M. & STOLZE, R.G. 1994. Pteridophyta of Peru. Part VI. 22. Marsileaceae-21. Isoetaceae. Fieldiana, n. s. 34: 1-190.
- TUCKER, M.R., PAECH, N.A., WILLEMSE, M.T.M. & A. M. KOLTUNOW. 2001. Dynamics of callose deposition and  $\beta$ -1,3- glucanase expression during reproductive events sexual and apomyctic *Hieracium*. Planta 212: 487-498.
- UEHARA, K & S. KURITA. 1991. Ultrastructural study on spore wall morphogenesis in *Lycopodium clavatum* (Lycopodiaceae). Amer. J. Bot. 78: 24-36.
- WATERKEYN, L., & A. BEINFAIT. 1970. On a possible function of the callosic special wall in *Ipomoea purpurea* (L.) Roth. Grana 10: 13-20.
- WEBSTER T.R. 1995. Demonstrating spore dispersal in the spikemoss, *Selaginella martensii*. Amer. Biol. Teacher. 57: 83-86.
- WIKSTRÖM, N., KENRICK, P., & M. W. CHASE. 1999. Epiphytism and terrestrialization in tropical *Huperzia* (Lycopodiaceae). Plant Syst. Evol. 218: 221-243.
- WIKSTRÖM, N., & P. KENRICK. 2001. Evolution of Lycopodiaceae (Lycopsidea): estimating divergence times from *rbcL* gene sequences by use of nonparametric rate smoothing. Mol. Phylo. Evol. 19: 177-186.

WILCE, J. H. 1972. Lycopod spores, I. General spore patterns and the generic segregates of *Lycopodium*. Amer. Fern J. 62: 365-79.

WILLIS, K. J & J. C. MCELWAIN. 2002. *The evolution of plants*. Oxford University Press.

WORRALL, D., HIRD, D.L., HODGE, R., PAUL, W., DRAPER, J. & R. SCOTT. 1992. Premature dissolution of the microsporocyte callose wall causes male sterility in transgenic tobacco. Plant Cell 4: 759-771.

ZHANG, C., GUINEL, F.C. & B.A. MOFFATT. 2002. A comparative ultrastructural study of pollen development in *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia and male-sterile mutant Apt1-3. Protoplasma 219: 59-71.